



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Estudio de la contribución de la vía de
Notch1 y sus efectores moleculares a la
patogénesis de la leucemia T
linfoblástica aguda (T-ALL)**

Tesis Doctoral

Marta Mosquera Sáiz
Madrid, 2015

Directora: Dra. M^a Luisa Toribio García



Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", centro mixto perteneciente a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad Autónoma de Madrid, con financiación de los proyectos: BFU2007-609990, PLE2009-0110 y SAF2010-15106 del Ministerio de Ciencia e Innovación; FP7-HEALTH-2013-INNOVATION-1 de la Unión Europea; SAF2013-44857-R del Ministerio de Economía y Competitividad y aecc-20134201 de la Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer.

Marta Mosquera Sáiz ha sido financiada mediante una beca predoctoral del programa FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación asociada al proyecto BFU2007-609990 y un contrato de Titulado Medio de Actividades Técnicas y Profesionales de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con financiación de los proyectos FP7-HEALTH-2013-INNOVATION-1 y SAF2013-44857-R.

El CBMSO recibe una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

ABREVIATURAS

En este trabajo hemos respetado las abreviaturas en inglés de muchos términos para facilitar su lectura junto con otros textos científicos.

8ISP: CD8 simple positiva inmadura (*CD8 Immature Single Positive*)
ADAM: *A Disintegrin and Metalloproteinase*
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
ANK: repeticiones tipo anquirina (*Ankyrin repeats*)
APC: alofococianina (*Allophycocyanin*)
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
B-ALL: leucemia linfoblástica aguda B (*B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*)
BSA: albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
CMJ: unión cortico-medular (*Cortico-Medullary Junction*)
CSC: célula madre cancerígena (*Cancer stem cell*)
DL: Delta-like (1,3,4)
DP: doble positiva ($CD4^+CD8^+$)
DN: doble negativa ($CD4^-CD8^-$)
EGF: factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)
ETP: progenitor tímico temprano (*Early Thymic Progenitor*)
FBS: suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)
FITC: isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein-isothiocyanate*)
Flt3l: ligando del receptor Flt3 (*Flt3 ligand*)
γc: cadena gamma común (*Gamma common*)
GFP: proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
GSI: inhibidor de gamma secretasa (*Gamma Secretase Inhibitor*)
HD: dominio de heterodimerización (*Heterodimerization Domain*)
HSC: célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem cell*)
ICN1: dominio intracelular de Notch1 (*Intracellular Notch1*)
IFM: intensidad de fluorescencia media
IGH: cadena pesada de las inmunoglobulinas (*Immunoglobulin Heavy Chain*)
IL-7: interleuquina 7
IL-7R: receptor de interleuquina 7
IL-7Rα: cadena α del receptor de interleuquina 7
IP: índice de proliferación
ITAM: motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)
IU: unidades internacionales (*International Units*)

Kb: kilobase
KDa: kilodalton
KI: ratón *Knock-in*
KO: ratón *Knock-out*
LIC: célula iniciadora de la leucemia (*Leukemia initiating cell*)
Lin⁻: ausencia de marcadores de linaje, ej: CD3⁻, B220⁻, CD11b⁻, etc.
MHC: complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)
MO: médula ósea
NK: células asesinas naturales (*Natural Killer*)
NLS: secuencia de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequence*)
NRN: región reguladora negativa (*Negative Regulatory Region*)
NSG: NOD SCID gamma
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
PE: ficoeritrina (*Phycoerithrin*)
PEST: secuencia P-E-S-T de Notch
PFA: paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)
PI3K: fosfoinositol-3 quinasa (*Phosphoinositol-3 Kinase*)
pTα: cadena α del pre-TCR
RAG: gen activador de la recombinación (*Recombinase-activating gene*)
RAM: módulo de asociación a RBPJκ (*RBPJκ association module*)
rh: recombinante humana
ROS: especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
SCF: factor de células madre (*Stem Cell Factor*)
SCID: inmunodeficiencia severa combinada (*Severe Combined Immunodeficiency*)
SEM: error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)
shRNA: horquilla de ARN (*short hairpin RNA*)
SOCS: supresor de la señalización por citoquinas (*Suppressor of Cytokine Signaling*)
SP: simple positiva (*Simple Positive*)
SPF: libre de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*)
TACE: enzima convertora de TNF-α (*TNF-α Converting Enzyme*)
TAD: dominio de transactivación (*Transactivation Domain*)
T-ALL: leucemia linfoblástica aguda T (*T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*)
TCR: receptor de antígenos de células T (*T Cell Receptor*)
TEC: célula epitelial tímica (*Thymic Epithelial Cell*)
TM: transmembrana
TSLP: linfopoyetina estromal tímica (*Thymic Stromal Lymphoietin*)
TSP: progenitor que coloniza el timo (*Thymus-seeding progenitor*)

SUMMARY

The development of T lymphocytes is a tightly regulated process that occurs within a dedicated organ, the thymus, which provides specific signals for an efficient generation of a broad repertoire of self-tolerant T cells. Among these signals, the interaction between the Notch1 receptor, expressed by thymic progenitors, and its Delta-like ligands, expressed on the surface of thymic epithelial cells (TECs), is crucial to drive T-cell specification from multipotent progenitors seeding the thymus and to support further progression along the T-cell lineage. Notch1 has also a unique role as a regulator of cellular expansion at two critical checkpoints sequentially controlled by the IL-7R and the pre-TCR complex. Given that aberrant Notch1 signalling gives rise to oncogenic transformation of developing thymocytes leading to T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and that some Notch1-associated oncogenic pathways also control survival and proliferation during normal T-cell development, it was hypothesized that IL-7R and pre-TCR may be essential mediators of Notch1-dependent leukemogenesis.

In this study we first confirmed that Notch1 is responsible for the stage- and lineage-specific expression of IL-7R α during murine thymopoiesis, pointing to IL-7R as a potential effector of Notch1 during T-ALL pathogenesis in the mouse. Taking advantage of a murine model of T-ALL generation, consisting in the transplantation of bone marrow (BM) progenitors overexpressing constitutively active mutant *NOTCH1* (ICN1) into immunodeficient mice, it was shown that active Notch1 induces the expression of functional IL-7Rs on leukemic cells. More importantly, it was demonstrated that IL-7R expression is essential for Notch1-induced leukemia generation, as ICN1-transduced BM progenitors from IL-7R α knock-out mice fail to induce T-ALL in transplanted hosts. Moreover, IL-7R expression supports leukemia progression *in vivo* and plays a crucial role in leukemia initiating cell (LIC) activity of T-ALL. Next, the study addressed the contribution of the pre-TCR complex to T-ALL pathogenesis. Using two murine models, the study showed that signalling through the pre-TCR is crucial for T-cell transformation driven by active Notch1. Particularly, induction of an active pre-TCR conformational state by CD3 ϵ , but not binding of Nck to the activated pre-TCR, is a limiting event in the pathogenesis of ICN1-dependent T-ALL. Therefore, Notch1 and pre-TCR activate downstream signalling pathways that may act synergistically to induce T-ALL.

In summary, our work highlights the absolute requirement of both IL-7R and pre-TCR for Notch1-dependent transformation of developing thymocytes, and point toward IL-7R and pre-TCR as novel therapeutic targets for treatment of T-ALL.

RESUMEN

El desarrollo de los linfocitos T es un proceso estrechamente regulado que tiene lugar en un órgano especializado, el timo, que proporciona señales específicas para una eficiente generación de un amplio repertorio de células T auto-tolerantes. Entre estas señales, la interacción del receptor Notch1, expresado por los progenitores intratímicos, y los ligandos Delta-like, expresados en la superficie de las células epiteliales tímicas (TECs), es crucial para dirigir la especificación al linaje T de los progenitores multipotentes que colonizan el timo, y para permitir su progresión a lo largo del linaje T. Notch1 desempeña, asimismo, una función como regulador de la expansión celular en dos puntos de control críticos durante la diferenciación T, controlados secuencialmente por el IL-7R y el complejo pre-TCR. Dado que la señalización aberrante de Notch1 da lugar a la transformación oncogénica de timocitos en desarrollo conduciendo a una leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL), y que algunas de las vías de señalización oncogénicas asociadas a Notch1 controlan también la supervivencia y proliferación durante el desarrollo normal de las células T, se hipotetizó que el IL-7R y el pre-TCR debían ser mediadores esenciales de la leucemogénesis dependiente de Notch1.

En primer lugar, confirmamos en este estudio que Notch1 es responsable de la expresión estadio y linaje específica de IL-7R α durante la timopoyesis de ratón, indicando que el IL-7R es un posible efector de Notch1 durante la patogénesis de la T-ALL en ratón. Haciendo uso de un modelo de ratón de generación de T-ALL, consistente en el trasplante de progenitores de médula ósea que sobre-expresan la forma constitutivamente activa de *NOTCH1* (ICN1) en ratones inmunodeficientes, se mostró que Notch1 activo induce la expresión de IL-7Rs funcionales en células leucémicas. Más importante, se demostró que la expresión del IL-7R es esencial para la generación de leucemia inducida por Notch1, ya que los progenitores de MO transducidos con ICN1 procedentes de ratones IL-7R α KO, no generaron leucemia en los ratones trasplantados. Más aún, la expresión del IL-7R participa en la progresión de la leucemia *in vivo* y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la actividad de célula iniciadora de leucemia en la T-ALL. A continuación, el estudio abordó la contribución del complejo pre-TCR a la patogénesis de la T-ALL. Usando dos modelos de ratón, el estudio mostró que la señalización a través del pre-TCR es crucial para la transformación de células T dependiente de la forma activa de Notch1. En concreto, la inducción de la conformación activa del pre-TCR por CD3 ϵ , pero no la unión de Nck al pre-TCR activado, es un evento limitante en la patogénesis de la T-ALL dependiente de ICN1. Por tanto, Notch1 y el pre-TRC activan vías de señalización que deben actuar sinérgicamente para inducir la T-ALL.

En resumen, nuestro trabajo pone de manifiesto el requerimiento absoluto del IL-7R y el pre-TCR para la transformación oncogénica dependiente de Notch1 de los timocitos en desarrollo, y señalan al IL-7R y pre-TCR como nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de la T-ALL.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. El proceso de diferenciación de los linfocitos T | 3 |
| 1.1. Estadios madurativos de la diferenciación intratímica | 3 |
| 1.2. El microambiente tímico | 6 |
| 2. Función de la vía de señalización de Notch en la diferenciación de los linfocitos T ... | 7 |
| 2.1. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos | 7 |
| 2.2. La vía de señalización de Notch..... | 9 |
| 2.3. Función de Notch1 en el desarrollo temprano de los linfocitos T | 10 |
| 2.3.1. Especificación del linaje T | 10 |
| 2.3.2. Proliferación de los progenitores intratímicos | 12 |
| 2.3.3. Función de Notch1 durante el proceso de selección β | 12 |
| 3. Función de la señalización a través del IL-7R durante el desarrollo de los linfocitos T | 13 |
| 3.1. La IL-7 en el desarrollo de los linfocitos T | 13 |
| 3.2. Estructura y función del IL-7R..... | 15 |
| 3.3. La vía de señalización IL-7/IL-7R..... | 16 |
| 4. Función de la señalización a través del pre-TCR durante el desarrollo de los linfocitos T | 18 |
| 5. Leucemias T linfoblásticas agudas (T-ALL) | 20 |
| 5.1. Función oncogénica de Notch1 en la T-ALL..... | 21 |
| 5.2. Implicación de la IL-7 y del IL-7R en la T-ALL..... | 24 |
| 5.3. Implicación del pre-TCR en la patogénesis de la T-ALL | 25 |
| 5.4. El modelo de célula madre tumoral | 26 |
| 5.5. Implicaciones terapéuticas..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| OBJETIVOS..... | 31 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 1. Líneas celulares | 37 |
| 2. Aislamiento de progenitores hematopoyéticos | 37 |
| 2.1. Progenitores de timo de ratón CD44 ⁺ CD25 ⁻ c-kit ⁺ (ETP) | 37 |
| 2.2. Progenitores de médula ósea de ratón Lin ⁻ c-kit ⁺ | 38 |
| 3. Análisis fenotípico de poblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo | 38 |
| 4. Sistema de diferenciación <i>in vitro</i> de progenitores hematopoyéticos de timo | 40 |
| 5. Ensayos <i>in vitro</i> de células leucémicas primarias | 40 |
| 5.1. Ensayos de proliferación en respuesta a IL-7 | 40 |
| 5.2. Ensayos de proliferación en respuesta a anti-CD3..... | 41 |
| 5.3. Análisis de fosforilación de proteínas por citometría de flujo | 41 |
| 6. Transducciones lentivirales..... | 42 |
| 7. Detección de proteínas mediante electroforesis y <i>Western blot</i> | 43 |
| 8. Generación de vectores y ensayos de detección de actividad luciferasa | 44 |
| 9. Inmunoprecipitación de cromatina | 44 |
| 10. PCR cuantitativa a tiempo real..... | 46 |
| 11. Animales de experimentación..... | 46 |
| 11.1. Mantenimiento y genotipado de ratones IL-7R α transgénicos | 47 |
| 11.2. Modelo de T-ALL en ratones inmunodeficientes | 47 |
| RESULTADOS..... | 49 |
| 1. Relevancia funcional de Notch1 en la regulación de la expresión y función del IL-7R durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T | 51 |
| 1.1. <i>Il7ra</i> es una diana transcripcional de Notch1..... | 51 |
| 1.2. La activación de Notch1 regula la expresión temporal del IL-7R durante la diferenciación intratímica de los linfocitos T de ratón..... | 53 |

2. El potencial leucemogénico de Notch1 es dependiente de la función del IL-7R57

2.1. Generación *in vivo* de leucemias T-ALL por la activación constitutiva de Notch157

2.2. Expresión de receptores funcionales de IL-7 en leucemias T-ALL inducidas *in vivo* por Notch164

2.3. La expresión del IL-7R es necesaria para la progresión *in vivo* de las T-ALL inducidas por la activación aberrante de Notch165

2.4. La expresión del IL-7R confiere una ventaja selectiva *in vivo* a las células T-ALL con actividad iniciadora de leucemia69

2.5. La expresión ectópica de IL-7R α no altera la generación de la T-ALL inducida por ICN171

2.6. La función del IL-7R es crucial en la patogénesis de la T-ALL inducida por Notch174

3. La señalización a través del pre-TCR es crucial en la patogénesis de la T-ALL dependiente de Notch178

3.1. La sobreexpresión de ICN1 no revierte el bloqueo en la diferenciación intratímica de los progenitores C80G con un pre-TCR no funcional.....78

3.2. La generación de T-ALL por sobreexpresión de ICN1 es dependiente de la señalización a través del pre-TCR.....81

3.3. La señalización mediada por Nck no es limitante en la patogénesis de la T-ALL inducida por ICN1, pero determina el tiempo de latencia de la enfermedad87

DISCUSIÓN95

CONCLUSIONES..... 115

BIBLIOGRAFÍA 119

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Página

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de diferenciación de los linfocitos T de ratón..... | 6 |
| Figura 2. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos..... | 8 |
| Figura 3. Vía de señalización de Notch | 10 |
| Figura 4. Esquema de la vía de señalización del IL-7R..... | 17 |
| Figura 5. Señalización a través del pre-TCR..... | 19 |
| Figura 6. Mutaciones activadoras de Notch1 en la T-ALL humana | 22 |

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Relación de líneas celulares empleadas en este estudio..... | 37 |
| Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para el aislamiento de progenitores de timo y de MO..... | 38 |
| Tabla 3. Relación de anticuerpos utilizados para la detección de antígenos mediante citometría de flujo..... | 39 |
| Tabla 4. Anticuerpos utilizados para <i>Western Blot</i> | 43 |
| Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo | 45 |
| Tabla 6. Sondas Taqman utilizadas en el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real | 46 |
| Tabla 7. Ratones utilizados durante la experimentación | 48 |

RESULTADOS

| | |
|---|----|
| Figura 7. Notch1 regula la transcripción del gen <i>Il7ra</i> de ratón..... | 52 |
| Figura 8. Poblaciones DN en el timo de ratón adulto..... | 54 |
| Figura 9. Notch1 controla la proliferación de los timocitos DN a través de la regulación de la expresión de IL-7R α | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 10. Modelo de generación de leucemias T-ALL inducidas por ICN1 en ratón..... | 58 |
| Figura 11. Generación extratímica de células DP en la MO de ratones trasplantados con progenitores Lin ⁻ c-kit ⁺ que sobre-expresan ICN1..... | 60 |
| Figura 12. Infiltración del bazo, hígado y timo por células ICN1 ⁺ en ratones trasplantados con progenitores Lin ⁻ c-kit ⁺ que sobre-expresan ICN1..... | 62 |
| Figura 13. Caracterización fenotípica y funcional de las células leucémicas generadas en ratones trasplantados con progenitores Lin ⁻ c-kit ⁺ que sobre-expresan ICN1 | 63 |
| Figura 14. Estudio de la clonalidad de las T-ALLs generadas <i>in vivo</i> | 64 |
| Figura 15. ICN1 induce la generación de T-ALLs que expresan IL-7Rs funcionales..... | 66 |
| Figura 16. Silenciamiento de la expresión de IL-7Rα en células EL4 | 67 |
| Figura 17. La expresión del IL-7R es necesaria para la expansión <i>in vivo</i> de las T-ALLs dependientes de ICN1 | 68 |
| Figura 18. La expresión del IL-7R confiere una ventaja selectiva <i>in vivo</i> a las células leucémicas T-ALL con actividad LIC | 70 |
| Figura 19. La expresión de un transgen <i>Il7ra</i> no altera la eficiencia de generación y expansión <i>in vivo</i> de células T ectópicas inducidas por ICN1 en la MO..... | 72 |
| Figura 20. La expresión ectópica de un IL-7R transgénico no altera la eficiencia de generación de T-ALL inducida por ICN1 ni el tiempo de latencia de la enfermedad..... | 73 |
| Figura 21. Fenotipo de las células de la MO de ratones <i>wild-type</i> y IL-7Rα KO y eficiencia de transducción con ICN1 de los correspondientes progenitores Lin ⁻ c-kit ⁺ tras su selección | 74 |
| Figura 22. La deficiencia del <i>Il7ra</i> impide la generación aberrante de células CD4 ⁺ CD8 ⁺ DP dependiente de ICN1 | 75 |
| Figura 23. La función del IL-7R es esencial para la generación de T-ALL inducida por ICN1 | 77 |
| Figura 24. Sobre-expresión de ICN1 en progenitores de MO de ratones <i>wild-type</i> y C80G | 79 |
| Figura 25. La expresión ectópica de ICN1 no revierte el bloqueo en la selección β de los timocitos C80G con un pre-TCR no funcional | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 26. La generación de células ectópicas DP en la MO por sobre-expresión de ICN1 es dependiente de la función del pre-TCR | 81 |
| Figura 27. Ausencia de células ICN1 ⁺ en la sangre periférica de los ratones trasplantados con progenitores de MO C80G transducidos con ICN1 | 83 |
| Figura 28. La señalización a través del pre-TCR es necesaria para la generación y expansión de células DP ICN1 ⁺ en la MO..... | 84 |
| Figura 29. Las células ICN1 ⁺ no infiltran el bazo ni el hígado de los ratones trasplantados | 85 |
| Figura 30. ICN1 requiere la presencia de un pre-TCR funcional durante el proceso de generación de la T-ALL | 87 |
| Figura 31. La ausencia de señalización mediada por Nck no impide la generación periférica de células T aberrantes DP inducida por ICN1..... | 88 |
| Figura 32. La señalización mediada por Nck no es limitante en la patogénesis de la T-ALL inducida por ICN1 | 89 |
| Figura 33. La inhibición del reclutamiento de Nck a CD3ε induce la deficiente señalización del complejo TCRαβ-CD3 en leucemias T-ALL dependientes de ICN1 | 91 |
| Figura 34. La señalización mediada por Nck determina el tiempo de latencia de la T-ALL dependiente de ICN1..... | 92 |

DISCUSIÓN

| | |
|--|----|
| Figura 35. Diferenciación intratímica de los linfocitos T | 96 |
|--|----|

Introducción ■

1. El proceso de diferenciación de los linfocitos T.

La totalidad de las células hematopoyéticas del individuo se originan a partir de un precursor común que se denomina célula madre hematopoyética (HSC; del inglés, *Hematopoietic Stem Cell*) y se caracteriza por ser pluripotente y por su capacidad de auto-renovación, y se localiza en la médula ósea (MO) en la vida post-natal. La hematopoyesis lleva implícita la generación de precursores intermediarios cuya capacidad de generación de linajes celulares va restringiéndose progresivamente como consecuencia de la activación de programas transcripcionales específicos. En el adulto, todos los linajes hematopoyéticos (linfoide, mieloide y eritroide) se generan *in situ* en la MO, a excepción de los linfocitos T, cuya diferenciación requiere un órgano linfoide especializado, el timo (Miller y Osoba, 1967). Los linfocitos T se desarrollan en el timo a partir de un progenitor hematopoyético linfomieloide procedente de las HSCs de la MO, que tiene potencial para generar células T y linajes alternativos, y que ha perdido la capacidad de auto-renovación, siendo necesario, por tanto, el influjo continuo de progenitores hematopoyéticos al timo para mantener una producción sostenida de células T (Fowlkes et al., 1985; Shortman y Wu, 1996; Weerkamp et al., 2006; Blom y Spits, 2006). El timo posee un microambiente único, constituido principalmente por células epiteliales tímicas o TECs (del inglés, *Thymic Epithelial Cells*), que proporcionan un nicho especializado para la generación eficiente de un repertorio diverso de células T auto-tolerantes. El contacto entre los progenitores intratímicos y las TECs es de crucial importancia ya que éstas expresan ligandos de los receptores de la familia Notch, que inducen la maduración de los primeros, y producen factores de crecimiento esenciales, como la interleuquina-7 (IL-7), que permiten instruir a los progenitores multipotentes que llegan al timo hacia el linaje T e inducir su proliferación y diferenciación en células T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$ maduras (Takahama, 2006; Blom y Spits, 2006; Ciofani y Zuñiga-Pflücker, 2007; Rothenberg, 2007; Petrie y Zuñiga-Pflücker, 2007).

1.1. Estadios madurativos de la diferenciación intratímica.

La identidad concreta del progenitor que migra desde la MO al timo para generar células T es todavía hoy en día muy discutida, debido al breve periodo de tiempo durante el cual circula por la sangre (del orden de segundos a minutos) y a su baja frecuencia (alrededor de 100 al día), lo que ha dificultado enormemente su estudio (Foss et al., 2001; Wright et al., 2001; Bhandoola et al., 2007). El progenitor más temprano que coloniza el timo o TSP (del inglés, *Thymus-Seeding Progenitor*) identificado hasta la fecha se ha definido por el fenotipo $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Flt3}^+ \text{CCR9}^+ \text{IL-7R}^{-/\text{lo}} \text{CD24}^{-/\text{lo}}$ (Allman et al., 2003; Porritt et al., 2004; Tan et al., 2005; Sambandam et al., 2005). Tradicionalmente,

se ha pensado que los progenitores T canónicos más tempranos o ETPs (del inglés, *Early Thymic Progenitors*) están contenidos en esta población, sin embargo, un trabajo del grupo de C. Guidos ha sugerido que los TSP y ETPs constituyen poblaciones celulares independientes, de manera que los ETPs representan la progenie generada a partir de los TSP tras recibir la señal de Notch1 (Tan et al., 2005).

La generación de linfocitos T a partir de los TSP es un proceso secuencial que implica la pérdida progresiva del potencial de generación de linajes hematopoyéticos no T (**Figura 1A**). En el timo del ratón, las células T más inmaduras se encuentran en la población intratímica conocida como doble negativa (DN), porque carece de la expresión de los correceptores CD4 y CD8, y supone un 3-5% del total de timocitos de un timo adulto. A su vez, las células DN se pueden dividir en cuatro subpoblaciones, que representan cuatro estadios madurativos sucesivos, atendiendo a la expresión de los marcadores CD44 y CD25: CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3) y CD44⁻CD25⁻ (DN4) (**Figura 1B**) (Godfrey et al., 1993). Los progenitores T más primitivos se encuentran en la subpoblación DN1, sin embargo, diversos estudios mostraron que ésta es una población heterogénea y sólo una pequeña fracción de las células DN1 contiene progenitores T canónicos o ETPs (Porritt et al., 2004). Los ETPs se caracterizan por la expresión de las moléculas CD44 y c-kit y por su capacidad de generar progenie DN2 de forma robusta (Porritt et al., 2004). Los ETPs y las células DN2 conservan el potencial para generar células NK (del inglés, *Natural Killer*) (Bhandoola et al., 2007), y células mieloides (Bell y Bhandoola, 2008), incluyendo macrófagos y células dendríticas, pero han perdido la capacidad de generar células B (**Figura 1A**). La pérdida del potencial B, que ocurre antes de llegar al timo o inmediatamente después de la entrada en dicho órgano (Harman et al., 2005; Heinzel et al., 2007), es uno de los primeros eventos madurativos durante la diferenciación de los linfocitos T, y el compromiso al linaje T se completa y se vuelve irreversible en el estadio DN3 (Shen et al., 2003; Schmitt et al., 2004; Balciunaite et al., 2005b).

Durante los estadios DN1-DN2 tiene lugar una extensa proliferación dependiente de la expresión del receptor de interleuquina-7 (IL-7R) y de su interacción con la IL-7 (**Figura 1B**), que representa un primer punto de control en el proceso de expansión intratímica, y tiene como función aumentar la población de células pro-T (Shortman et al., 1990; Sudo et al., 1993). En el estadio DN2, comienzan los reordenamientos en los loci *Tcrb*, *Tcrγ* y *Tcrδ* de los genes que codifican para las cadenas β, γ, y δ del receptor de antígeno de las células T o TCR (del inglés, *T Cell Receptor*), mediados por *Rag1* y *Rag2* (del inglés, *Recombinase-activating gene*) (Burtrum et al., 1996). Este proceso se completa en el siguiente estadio, DN3. Las células con reordenamientos satisfactorios de TCRγ y TCRδ se diferenciarán a células γδ (Passoni et al., 1997). En cambio, aquellos timocitos con un reordenamiento productivo para TCRβ expresarán en la membrana el

complejo denominado pre-TCR, formado por una cadena pre-TCR α (pT α) asociada a la cadena TCR β recién formada y a las cadenas CD3 γ , δ , ϵ y ζ . La expresión del pre-TCR señala para un segundo punto de control crítico en la expansión y en el desarrollo intratímico, denominado selección β (Hoffman et al., 1996). La señalización a través de este complejo se traduce en una señal de supervivencia; sólo los timocitos con un TCR β funcional van a ser seleccionados para continuar el proceso madurativo T (von Boehmer et al., 1998). La selección β implica, asimismo, una enorme expansión de los timocitos DN3 (100-1000x); el cese de los reordenamientos de la cadena β y, por tanto, la inducción de la exclusión alélica en el *locus Tcrb*; el inicio de los reordenamientos en el *locus Tcra* y la diferenciación al estadio DN4. La expresión diferencial de la molécula CD27 permite identificar aquellas células DN3 que han sufrido el proceso de selección β , de modo que la población DN3 se puede dividir en dos subpoblaciones: DN3a, previa a la selección β y negativa para el marcador CD27, y DN3b, constituida por timocitos que han sido satisfactoriamente seleccionados y que expresan el pre-TCR y niveles altos de CD27 (Taghon et al., 2006). Tras la selección β , las células pierden la expresión de CD25 (DN4) y el complejo pre-TCR desaparece de la membrana. A continuación, se produce la expresión de la molécula CD8, dando lugar a la población de timocitos inmaduros simples positivos o CD8 ISP (del inglés, *Immature Single Positive*), que a su vez se diferenciarán en células CD4⁺ CD8⁺ doble positivas (DP), las cuales expresan un complejo TCR $\alpha\beta$ maduro en la membrana (Kruisbeek et al., 2000).

El conjunto de los timocitos DP, que supone el 95-98% del total de timocitos, es objeto del proceso de selección positiva, que asegura la generación de células T maduras con receptores TCR $\alpha\beta$ diferentes distribuidos clonalmente, capaces de reconocer cualquier péptido antigénico presentado por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad o MHC (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*) expresado por las células epiteliales del timo, proceso conocido como restricción MHC. A continuación, tiene lugar la selección negativa mediante la cual se induce tolerancia a antígenos propios, eliminándose aquellos timocitos con TCR $\alpha\beta$ auto-reactivos (Amsen y Kruisbeek, 1998). Finalizados ambos procesos, los timocitos terminan su diferenciación como células T maduras simples positivas o SP (del inglés, *Simple Positive*) CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ o CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ y adquieren moléculas que permiten su salida del timo y migración a la periferia.

En resumen, durante la diferenciación temprana de los linfocitos T tienen lugar dos puntos de control críticos en los que se produce una extensa proliferación: un primer punto de control dependiente del IL-7R y otro, más tardío, mediado por el pre-TCR; ambos necesarios para asegurar la generación de una población abundante de células DP, y en último término, un repertorio diverso de células SP maduras.

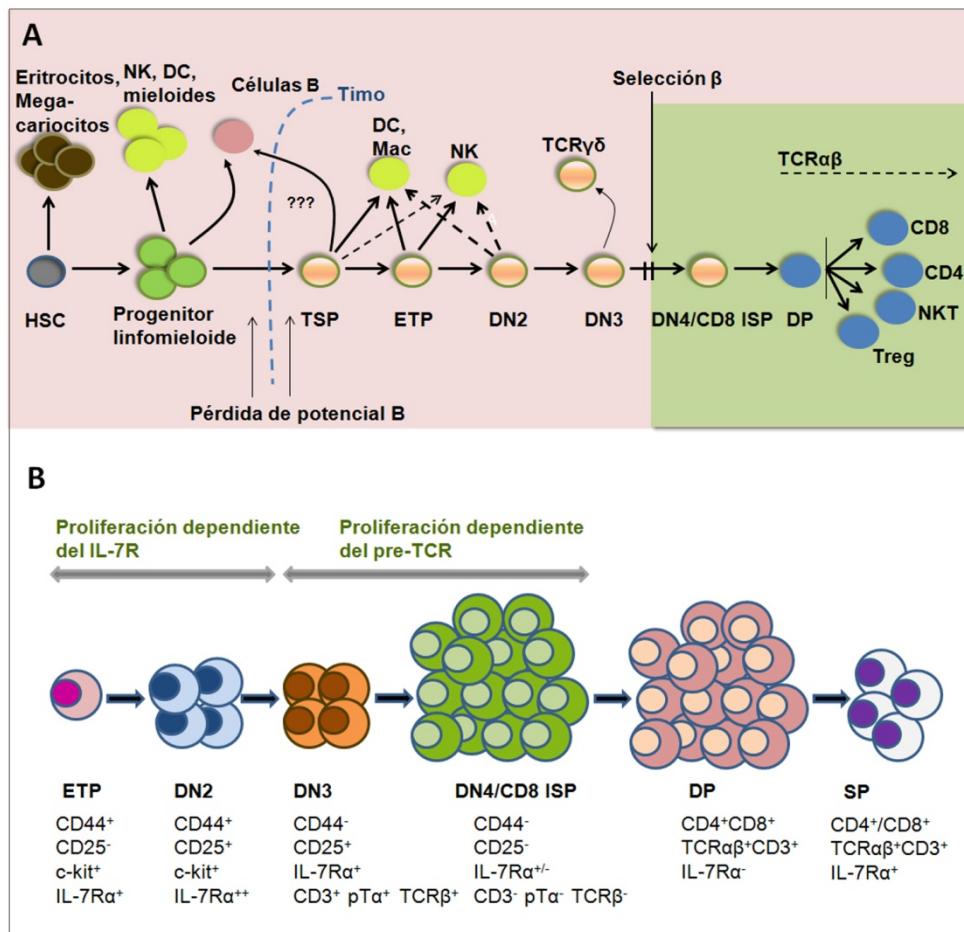


Figura 1. Esquemas de diferenciación de los linfocitos T de ratón. (A) Secuencia de pérdida de linajes alternativos al linaje T que conduce a la generación de linfocitos T maduros. (B) Estadios de la diferenciación intratímica de los linfocitos T y marcadores de superficie expresados. Se señalan los dos puntos de control responsables de la expansión intratímica.

1.2. El microambiente tímico.

Los distintos procesos que tienen lugar durante la diferenciación de los linfocitos T requieren la migración coordinada de los timocitos a través del timo para acceder a los microambientes concretos capaces de proporcionar las señales específicas de proliferación, diferenciación y supervivencia de cada estadio madurativo. Dicha migración está dirigida por las quimioquinas producidas por las células del estroma tímico, que aseguran que los linfocitos T en desarrollo se encuentren posicionados en el nicho apropiado en cada momento de la diferenciación (revisado en Ciofani y Zuñiga-Pflücker, 2007). El timo está dividido en dos regiones histológicamente definidas, la corteza y la médula, cada una formada por distintos subtipos de TECs especializadas y separadas por la unión cortico-medular o CMJ (del inglés, *Cortico-Medullary Junction*).

Los progenitores TSP acceden al timo a través de los vasos sanguíneos situados en la CMJ y, a continuación, inician la migración por la corteza hasta la región subcapsular, zona más externa del timo, donde tiene lugar la selección β . Las células DP migran de nuevo a la corteza y, tras la selección positiva los timocitos SP entran en la médula, donde ocurre la selección negativa (Petrie y Zuñiga-Pflücker, 2007). Las TECs corticales, por tanto, están especializadas en el proceso de adquisición del compromiso a linaje T, en la diferenciación durante los estadios DN y en los procesos de selección β y selección positiva. Por el contrario, las TECs que se encuentran en la médula proporcionan un microambiente especializado para una eficiente selección negativa.

2. Función de la vía de señalización de Notch en la diferenciación de los linfocitos T.

Durante los últimos años se han identificado algunos de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de diferenciación de los progenitores intratímicos, siendo la señalización mediada por el receptor Notch1 uno de los más relevantes. Notch1 pertenece a una familia evolutivamente conservada de receptores de membrana implicados en procesos de proliferación, apoptosis y especificación de linaje en múltiples sistemas celulares, entre los que se encuentran las células hematopoyéticas (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Las diversas funciones de Notch están mediadas por una vía de señalización conservada, que implica varios cortes proteolíticos del receptor y la traslocación nuclear de su región intracelular para activar la transcripción de genes diana (revisado en Kopan y Ilagan, 2009).

2.1. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos.

La familia de receptores Notch está formada por cuatro miembros en mamíferos (Notch1-4). Los receptores Notch se sintetizan como un precursor de 300 KDa en el retículo endoplásmico, que es glicosilado por las enzimas O-fucosil transferasas. Durante el tránsito a la membrana es transportado a la red *trans* Golgi donde sufre un corte proteolítico por una proteasa tipo furina en la región extracelular cercana a la membrana (sitio S1) dando lugar a un receptor heterodimérico, en el que la subunidad extracelular está unida de forma no covalente a la subunidad transmembrana (**Figura 2A**). El dominio extracelular está constituido por 29-36 repeticiones del tipo factor de crecimiento epidérmico o EGF (del inglés, *E*pidermal *G*rowth *F*actor), algunas de las cuales median las interacciones con los ligandos DSL (*D*elta-*S*errate-*L*ag2), y por una región reguladora negativa o NRR (del inglés, *N*egative *R*egulatory *R*egion), que evita la

INTRODUCCIÓN

señalización del receptor en ausencia de ligando. La región reguladora negativa está formada por 3 repeticiones de tipo Lin12-Notch (LNR; del inglés, *Lin Repeats*) y un dominio de heterodimerización o HD (del inglés, *Heterodimerization Domain*), responsable de la asociación estable del heterodímero. La región intracelular de Notch, denominada ICN (del inglés, *Intracellular Notch*), contiene varios dominios que median la transducción de señales. Estos incluyen repeticiones tipo RAM (del inglés, *RBPjk Association Module*), responsable de la unión al factor de transcripción RBPjk o CSL (*CBF1/RBPjk* en mamíferos, *Su(H)* en *Drosophila* y *LAG-1* en *C.elegans*); repeticiones tipo anquirina (ANK), que interaccionan con proteínas efectoras; dos secuencias de localización nuclear o NLS (del inglés, *Nuclear Localization Sequence*) y un dominio de transactivación o TAD (del inglés, *Transactivation Domain*), que contiene la secuencia PEST C-terminal, encargada de regular la estabilidad de la proteína, ya que posee un motivo necesario para la ubiquitinación, llevada a cabo por las ligasas de ubiquitina Fbw7 y Sel10 (Maillard et al., 2005).

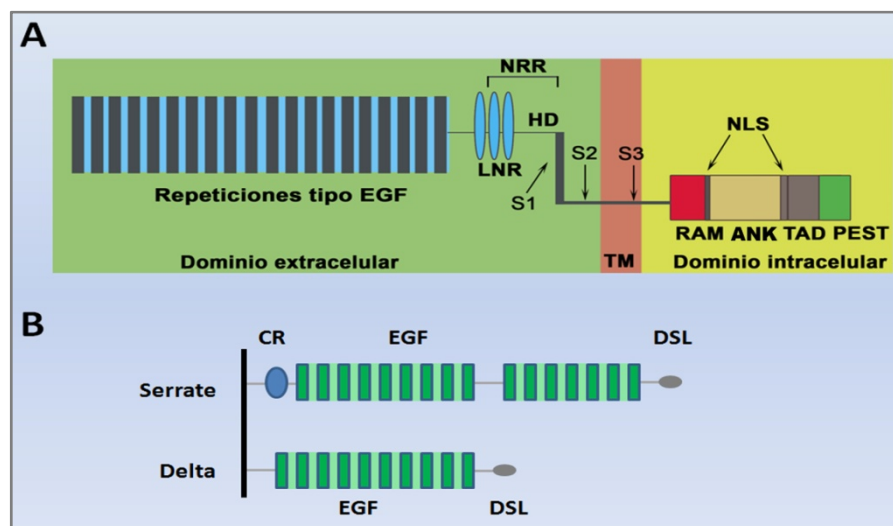


Figura 2. Estructura de los receptores Notch (A) y sus ligandos (B). CR: cysteine rich

Los receptores Notch reconocen ligandos canónicos de la familia tipo Delta o de la familia Serrate (Jagged en mamíferos). Los mamíferos poseen dos ligandos de la familia Serrate (Jag1 y 2) y tres ligandos de la familia tipo Delta (DL1, 3 y 4). Estos ligandos son proteínas transmembrana cuyos dominios extracelulares contienen un motivo DSL (del inglés, *Delta-Serrate-Lag2*, el homólogo en *C. elegans*) en el extremo N-terminal y repeticiones tipo EGF (**Figura 2B**). A diferencia de Notch, el dominio intracelular de los ligandos está poco conservado, sin embargo, tiene funciones importantes ya que su eliminación da lugar a fenotipos de pérdida de función (Pear y Radtke, 2003). La afinidad de los receptores por sus ligandos puede ser modulada por la actividad de las enzimas glicosil-transferasas de la familia Fringe, que modifican el

dominio extracelular de Notch de manera que Delta, pero no Jagged, puede iniciar la señalización (Moloney et al., 2000). En el timo, la expresión de los ligandos de Notch se localiza preferentemente en TECs y en el endotelio vascular. Varios trabajos han concluido que DL4 se expresa en TECs que se encuentran en la región subcapsular y en la corteza externa, área donde tiene lugar la diferenciación de los timocitos DN, por tanto, la expresión de DL4 en esa región permite la activación de Notch1 en los progenitores intratímicos más tempranos (Mohtashami et al., 2010). La ausencia de expresión de DL4 en células TECs de ratones KO (del inglés *Knock-out*) para este ligando impide la generación de linfocitos T, indicando que DL4 es el ligando fisiológico de Notch1 responsable de la diferenciación T en el timo (Koch et al., 2008; Hozumi et al., 2008). Sin embargo, la expresión de DL1 parece confinada a los vasos sanguíneos (Hozumi et al., 2008). Los ligandos Jag1 y Jag2 también se expresan en el timo, concretamente en la médula, aunque Jag2 también está presente en la corteza interna (Mohtashami et al., 2010).

2.2. La vía de señalización de Notch.

La señalización se inicia cuando un receptor Notch reconoce un ligando específico expresado en la superficie de una célula vecina (**Figura 3**). Esta interacción provoca un cambio conformacional en el receptor que tiene como resultado la exposición del sitio S2 y el corte proteolítico por metaloproteasas de la familia ADAM (del inglés, *A Disintegrin And a Metalloprotease*), concretamente por ADAM10 (o Kuzbanian) (van Tetering et al., 2009) y ADAM17 (o TACE; del inglés, *TNF- α Converting Enzyme*) (Brou et al., 2000). Aunque ambas metaloproteasas son capaces de activar la vía de Notch, se ha propuesto que específicamente ADAM10 procesaría Notch en un contexto dependiente de ligando (Bozkulak y Weinmaster, 2009). Aunque este trabajo sugirió la actividad preferencial de ADAM17 en el corte proteolítico en ausencia de ligando, como es el caso de las mutaciones activadoras de Notch1, el grupo de A. Ferrando describió posteriormente la contribución tanto de ADAM10 como ADAM17 a la activación oncogénica de Notch1 (Sulis et al., 2011). El corte por ADAM ocurre en la región extracelular, cercana a la región transmembrana, y da lugar a una isoforma del receptor anclada a la membrana que carece del dominio extracelular. Esta isoforma sufre un tercer corte proteolítico, que tiene lugar en la región transmembrana (S3), y está mediado por un complejo con actividad γ -secretasa formado por las enzimas presenilina, nicastrina, APH-1 y PEN-2, que resulta en la liberación del dominio intracelular (ICN) al citoplasma. Una vez en el citoplasma, la forma activa de Notch se trasloca al núcleo y se une al factor de transcripción CSL/RBPjk. En estado basal, CSL recluta deacetilasas de histonas y se une a correpresores como Nrarp, SMRT/NcoR y

SHARP/MINT/SPEN, que inhiben la transcripción. La interacción con ICN desplaza a los correpresores y provoca el reclutamiento de coactivadores (proteínas de la familia MAML, CBP/p300), formándose un complejo activador de la transcripción (revisado en Maillard et al., 2005). Las principales dianas de Notch son las proteínas de la familia bHLH (del inglés, *basic Helix Loop Helix*) Hes y Hey (Jarriault et al., 1995), genes implicados en proliferación y supervivencia como ciclina D1 (Ronchini y Capobianco, 2001), ciclina D3 (Sicinska et al., 2003) y c-myc (Weng et al., 2006), y genes específicos de la diferenciación T, como CD25 (Adler et al., 2003) y pTα (Reizis y Leder, 2002). Datos recientes de nuestro laboratorio indican que Notch1 también regula la expresión del IL-7R en humanos (Gonzalez-Garcia et al., 2009).

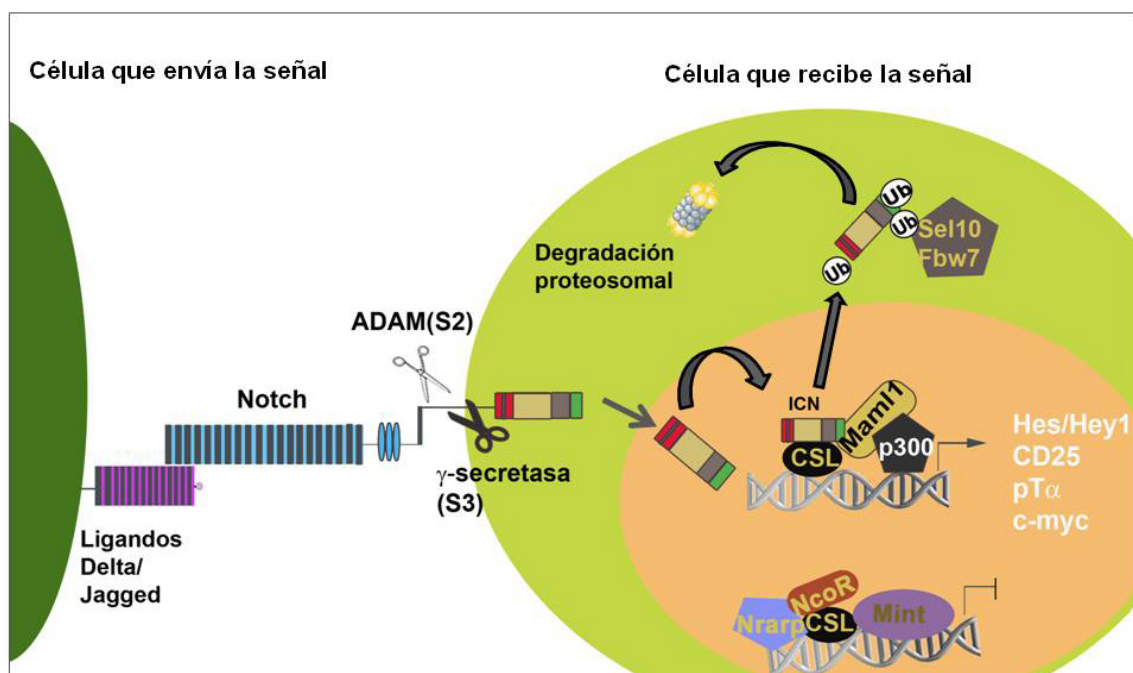


Figura 3. Vía de señalización de Notch.

2.3. Función de Notch1 en el desarrollo temprano de los linfocitos T.

2.3.1. Especificación del linaje T.

Diversos estudios realizados en ratón han permitido establecer que la señalización por Notch1 juega un papel crucial en el proceso de especificación del linaje T en el timo. En primer lugar, la generación de ratones deficientes en Notch1 (Notch1^{-/-}) demostró que en ausencia de Notch1 se produce un bloqueo en la diferenciación T y un aumento aberrante de células B B220⁺ en el timo (Radtke et al., 1999). En un trabajo posterior, se obtuvieron resultados muy similares mediante la inactivación inducible de

CSL/RBPjk en células de la MO (Han et al., 2002). El fenotipo prácticamente idéntico de los ratones *Notch1^{-/-}* y *CSL/RBPjk^{-/-}* permitió establecer que Notch1 señala a través de CSL/RBPjk de manera no redundante para especificar el linaje T. Estudios complementarios de ganancia de función mostraron que la expresión de Notch1 era suficiente para promover el desarrollo de células T fuera del timo (Pui et al., 1999), ya que la expresión de una forma constitutivamente activa de Notch 1 (ICN1) en progenitores de la MO de ratón inhibía completamente la generación de linfocitos B y células mieloides, y resultaba en la producción ectópica de una población aberrante de células T DP TCR $\alpha\beta$ en la MO (Pui et al., 1999). Colectivamente, estos estudios demostraron que los progenitores procedentes de la MO tienen que activar Notch1, inmediatamente antes, durante, o inmediatamente después de su entrada en el timo, para suprimir el potencial no T y dirigir a los progenitores linfomieloides hacia el linaje T. Una vez extinguido el potencial no T, la señalización continua por Notch1 es esencial para mantener el programa de diferenciación T a lo largo de los estadios tempranos intratímicos DN1-DN3, ya que en estudios *in vitro* este proceso se detiene cuando los progenitores se cultivan sobre células estromales OP9 que no expresan ligandos de Notch1 (Schmitt et al., 2004). Durante estos estadios tempranos, la señal de Notch1 no sólo se requiere para bloquear la generación de células dendríticas, macrófagos y células NK (Schmitt et al., 2004; Yui et al., 2010), sino que Notch1 es también esencial para inducir la proliferación de los timocitos DN en el timo (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Asimismo, la señalización por Notch1 es necesaria para inducir la proliferación durante el proceso de selección β , y para mantener el proceso de diferenciación y la generación de células DP (Sambandam et al., 2005; Tan et al., 2005). La señalización por Notch1, por tanto, inicia y sostiene la diferenciación T durante los estadios pro-T hasta el estadio pre-T. De acuerdo con esta función, la expresión de Notch1 es alta en timocitos DN y baja en células DP, siendo intermedia en células SP maduras (Hasserjian et al., 1996), donde su función está todavía mal caracterizada (Wolfer et al., 2001).

Los estudios realizados sugieren que Notch1 desempeña ambas funciones, instructiva y selectiva, durante la diferenciación intratímica. El papel instructivo de Notch1 en el desarrollo linfoide T consiste en la inducción de un programa transcripcional específico y la supresión de potenciales alternativos. Para la generación de las células pro-T es necesario que los factores de transcripción EBF y Pax5, críticos para la diferenciación del linaje B, se silencien. El mecanismo de silenciamiento no se ha definido por completo, pero se ha sugerido la participación de Notch1 en el bloqueo de la inducción de ambos factores (Taghon et al., 2005). Además de Notch1, la pérdida de la expresión del represor transcripcional *Zbtb7a* o LRF, podría contribuir a la pérdida del potencial B (Allman et al., 2003). A continuación, la señalización por Notch1 restringe el potencial de los progenitores DN1 y DN2 para generar linajes mieloides, limitando la actividad de factores de transcripción cruciales como PU.1 y C/EBP α , y para el linaje NK

mediante el bloqueo de Id2 (revisado en Rothenberg, 2007). Para la instrucción del linaje T, Notch1 induce de manera directa la expresión de genes específicos como *Ptcra* y *Il2ra*, y de genes no específicos de linaje, como *Hes1* (De Obaldia et al., 2013). Además de la función de Notch1, el proceso de especificación de linaje T requiere la expresión y función de un grupo diverso de factores de transcripción que cooperan con Notch1, entre los que se encuentran Gata3, Myb, Runx1-CBF β , E2A, TCF-1, Bcl11b, GFI1 y miembros de la familia de Ikaros (revisado en Rothenberg et al., 2008). Un trabajo reciente ha demostrado que el papel instructivo de Notch1 está también mediado por la regulación transcripcional de TCF-1, que a su vez, regula Gata3, Bcl11b y componentes del TCR (Weber et al., 2011; Rothenberg, 2012).

2.3.2. Proliferación de los progenitores intratímicos.

Trabajos recientes de nuestro laboratorio en el sistema humano han puesto de manifiesto que la señalización por Notch1, además de inducir la inhibición de la diferenciación de los progenitores intratímicos en células de linajes no T, juega un papel esencial en su proliferación durante la diferenciación intratímica. Un primer estudio reveló que los progenitores intratímicos linfomieloides (ETP) en los que se sobre-expresaba ICN1 mostraban una gran capacidad proliferativa que era dependiente de IL-7 (Garcia-Peydro et al., 2006), sugiriendo una relación funcional entre la vía de señalización de Notch1 y la vía mediada por el IL-7R. Un trabajo posterior, demostró que Notch1 regula la transcripción del gen *IL7R* en timocitos humanos mediante su unión a un sitio CSL localizado en el promotor del gen, controlando así la expresión de la cadena IL-7R α del IL-7R y la expresión de un IL-7R funcional durante el desarrollo T (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Por tanto, una de las funciones principales de Notch1 durante la diferenciación de los linfocitos T en el timo humano es la amplificación de la población de progenitores tempranos que han iniciado el programa madurativo del linaje linfóide T, y dicha función se lleva a cabo mediante la regulación transcripcional del *IL7R*. Si bien existen trabajos que han estudiado la posible cooperación de Notch1 y la IL-7 durante la diferenciación de los timocitos de ratón (Balciunaite et al., 2005a; Wang et al., 2006), la relación funcional de ambas vías en ratón era desconocida al inicio de este estudio.

2.3.3. Función de Notch1 durante el proceso de selección β .

Diversos estudios han puesto de manifiesto que las señales de Notch1 son necesarias durante el proceso de la selección β . Inicialmente se propuso una función directa de Notch1 en la inducción de reordenamientos en el *locus Tcrb*, pero estos trabajos aportaron información conflictiva respecto al mecanismo e importancia de esta función (Wolfer et al., 2002; Tanigaki et al., 2004). Por otro lado, la demostración de que

Notch1 induce la transcripción de *Ptcra*, que codifica para la cadena pT α (Reizis y Leder, 2002), sugirió que la principal función de Notch1 durante la selección β podría ser la regulación de la expresión del pre-TCR. Sin embargo, estudios posteriores han descartado esta posibilidad y han mostrado que la función de Notch1 durante la selección β es independiente del pre-TCR, ya que la expresión ectópica de una cadena TCR β funcional en timocitos DN3 que no expresaban pre-TCR (*Rag2*^{-/-}) no era suficiente para restaurar la progresión al estadio DP en ausencia de señalización por Notch1 (Ciofani et al., 2004). Por otro lado, el cultivo de células DN3 con un pre-TCR intacto en ausencia de Notch1, es insuficiente para mantener su supervivencia y proliferación (Ciofani et al., 2004). Posteriormente, se demostró que la función de Notch1 durante la selección β en el mantenimiento de la supervivencia de las células pre-T se realiza mediante la regulación del metabolismo celular a través de la vía PI3K/AKT (Ciofani y Zúñiga-Pflücker, 2005). Por último, un estudio de ratones condicionales que expresan una forma dominante negativa del activador de Notch MAML1 (DNMAML^{f/+}), confirmó el requerimiento absoluto, e independiente del pre-TCR, de la señalización por Notch1 para mantener la proliferación y supervivencia celular durante la selección β (Maillard et al., 2006).

En resumen, la activación de Notch1 es crucial durante la timopoyesis temprana para inducir la especificación del linaje T en los progenitores linfomieloides que colonizan el timo y para mantener la proliferación de las células pro-T y, más adelante, durante la selección β , Notch1 asegura la expansión de las células pre-T con un repertorio TCR β funcional, su diferenciación en células portadoras de un TCR $\alpha\beta$ y la generación de linfocitos T maduros.

3. Función de la señalización a través del IL-7R durante el desarrollo de los linfocitos T.

3.1. La IL-7 en el desarrollo de los linfocitos T.

La IL-7 es una citoquina de 25 KDa que se clasifica como una citoquina de tipo 1 de cadena corta perteneciente a la superfamilia de la hematopoyetina, que incluye también a la IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-9, IL-13, IL-15, M-CSF y SCF. La producción de la IL-7 se lleva a cabo por células estromales del timo y de la MO. En concreto, las células encargadas de su generación en el timo son las TECs de la corteza que expresan moléculas MHC de clase II (Oosterwegel et al., 1997). Esta subpoblación de TECs también produce el ligando de c-kit, conocido como SCF (del inglés, *Stem Cell Factor*), que ejerce un efecto sinérgico junto con la IL-7 en la inducción de la proliferación de los

timocitos más tempranos. Se han descrito sitios alternativos de producción de IL-7 como son el epitelio intestinal, queratinocitos de la piel, hígado fetal, hígado adulto, células dendríticas y células dendríticas foliculares (Fry y Mackall, 2002; Jiang et al., 2005); sin embargo, no se ha detectado ARNm de IL-7 en linfocitos normales. La IL-7 se produce de manera constitutiva y se une a componentes de la matriz extracelular como glicosaminoglicanos, fibronectina y heparán sulfato, lo que permite regular la disponibilidad local de IL-7 (Ariel et al., 1997).

El papel crucial de la IL-7 en el desarrollo intratímico de los linfocitos T se puso de manifiesto inyectando anticuerpos específicos contra el IL-7R en ratones *wild-type* (Sudo et al., 1993) y en modelos de ratón deficientes en IL-7 (von Freeden-Jeffry et al., 1995), y en la cadena IL-7R α del receptor (Peschon et al., 1994), en los que se observaba una disminución drástica de la celularidad intratímica y periférica. En los ratones IL-7^{-/-}, el número total de timocitos se encuentra disminuido 20 veces con respecto a un ratón *wild-type* de edad similar, y se observa un bloqueo parcial en la diferenciación intratímica, con una acumulación de timocitos DN. En los ratones IL-7R^{-/-}, la celularidad está reducida entre 10 y 10.000 veces con respecto a un timo normal, detectándose un bloqueo en los estadios DN más inmaduros. Si bien el bloqueo de la diferenciación no es completo, ya que se pueden encontrar células maduras en los órganos linfoides periféricos de dichos ratones (Peschon et al., 1994; Maraskovsky et al., 1997), la respuesta frente a antígeno de los linfocitos T deficientes en IL-7R es menos eficiente que la de los linfocitos T *wild-type* (Maraskovsky et al., 1996). Además, la población de células $\gamma\delta$ está completamente ausente en estos ratones, poniendo de manifiesto el papel crucial de la señalización mediada por la IL-7 en el desarrollo del linaje $\gamma\delta$ (Maki et al., 1996). La IL-7 también desempeña un papel esencial en la generación de células B, observándose un bloqueo de la diferenciación B tanto en los ratones IL-7^{-/-} como en los IL-7R^{-/-}. Por el contrario, la vía del IL-7R parece ejercer una función selectiva en el linaje T en humanos. Se ha observado un bloqueo en el desarrollo tímico en individuos con inmunodeficiencia severa combinada o SCID (del inglés, *Severe Combined Immunodeficiency Syndrome*) debido a una mutación en la cadena α (Puel et al., 1998) o en la cadena γ c (Noguchi et al., 1993) del IL-7R. Sin embargo, la diferenciación de células B en estos pacientes no se ve afectada, reflejando requerimientos distintos de la señalización a través del IL-7R en ratón y humano.

Las funciones de la IL-7 durante la diferenciación de los linfocitos T son múltiples. La unión de la IL-7 a su receptor juega un papel no redundante en la diferenciación T, promoviendo la supervivencia y la expansión de los precursores DN1 y DN2 (Shortman et al., 1990; Peschon et al., 1994). Aunque su función parece prescindible a partir del estadio DN3, tras la selección positiva su actividad se restaura (Munitic et al., 2004; Yu et al., 2004; Yu et al., 2006). La función del IL-7R durante el proceso de selección β ha

estado muy discutida (Trigueros et al., 2003), pero muy recientemente se ha revelado un papel novedoso de la IL-7 durante este proceso, en la regulación del metabolismo y de la proliferación de los precursores T junto con Notch y el pre-TCR (Boudil et al., 2015). En células SP periféricas, el IL-7R proporciona señales de supervivencia, facilita la generación de células T de memoria (Schluns et al., 2000) y contribuye a la coestimulación de las células T, potenciando la proliferación y la producción de citoquinas (Costello et al., 1993). Asimismo, la diferenciación de las células T $\gamma\delta$ es completamente dependiente de la IL-7, ya que regula la accesibilidad al *locus Tcr γ* durante los reordenamientos a través de STAT5, mediante la acetilación de histonas (Huang et al., 2001; Ye et al., 2001).

3.2. Estructura y función del IL-7R.

El IL-7R es un heterodímero formado por dos cadenas, la cadena IL-7R α (también conocida como CD127) y la cadena γ común (γ c) compartida por varios receptores de citoquinas como IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 (Leonard, 2001). Ambas cadenas son necesarias para la señalización del IL-7R. La cadena γ c está presente en la mayor parte de las células hematopoyéticas; sin embargo, la cadena IL-7R α se expresa específicamente en células del linaje linfóide, en las cuales juega un papel crucial. La cadena IL-7R α también forma parte del receptor de la linfopoyetina o TSLP (del inglés, *Thymic Stromal Lymphopoietin*), hecho que explica el mayor descenso en la celularidad tímica en los ratones IL-7R $^{-/-}$ que en los IL-7 $^{-/-}$ (Park et al., 2000).

La función del IL-7R durante el desarrollo intratímico es dependiente del estricto control de la expresión del IL-7R. La cadena γ c se expresa constitutivamente en los precursores que llegan al timo, mientras que la expresión de la cadena IL-7R α se regula de una forma estadio-específica. El IL-7R se expresa por primera vez en progenitores ETP en tránsito hacia DN2 (Porritt et al., 2004). Su expresión declina paulatinamente después del estadio DN2 y debe terminar antes del estadio DP, pero el IL-7R se re-expresa tras la selección positiva en timocitos SP (Munitic et al., 2004; Yu et al., 2004; Yu et al., 2006). Esta estricta regulación de la expresión del IL-7R es necesaria para mantener un balance funcional entre la producción y el consumo de IL-7. De hecho, se ha sugerido que la pérdida de expresión del IL-7R en células DP es un acto altruista, requerido para asegurar el suministro de IL-7 a células DN, ya que se ha observado que, en ratones transgénicos para IL-7R α cuyas células DP expresan IL-7R, existe una competición entre las células DN y DP por la IL-7 limitante, que induce hipoplasia tímica (Munitic et al., 2004). Además, la disminución de la expresión de IL-7R α es necesaria para la transición del estadio ISP al DP, debido a que la señalización a través del IL-7R inhibe la expresión

de factores de transcripción requeridos durante este proceso como TCF-1, LEF-1, ROR γ y ROR γ t (Yu et al., 2004). Más aún, para garantizar la insensibilidad a la IL-7, las células DP poseen mecanismos como la expresión de supresores de señalización de citoquinas o SOCS (del inglés, *Supresor of Cytokine Signaling*) (Yu et al., 2006).

La regulación estadio-específica de la función del IL-7R se lleva a cabo mediante estrictos mecanismos moleculares. En precursores linfoides tempranos y progenitores de células B de ratón, la transcripción del gen *Il7ra*, que codifica para IL-7R α , está regulada por el factor de transcripción de la familia Ets, PU.1 (Anderson et al., 1999; DeKoter et al., 2002). En el timo, PU.1 se expresa en los progenitores más tempranos pero debe ser silenciado para su progresión a lo largo del linaje T (Anderson et al., 2002). En células T maduras otro miembro de la familia Ets, GABP α , parece controlar la expresión del gen *Il7ra*, pero no se ha podido demostrar su implicación en el desarrollo temprano intratímico (Xue et al., 2004). Además, se han identificado otros factores capaces de promover la expresión de IL-7R α en células T, como los factores de transcripción de la familia runt, Runx1 y Runx3 (Egawa et al., 2007), y el factor FoxO1, que regula la transcripción del *Il7ra* mediante su unión a un enhancer (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009). Sin embargo, los efectos de Runx y FoxO1 parecen restringidos a células T periféricas. Un trabajo reciente de nuestro grupo demostró que la regulación de la expresión de IL-7R α durante la diferenciación intratímica temprana se controla directamente por Notch1 en timocitos humanos (Gonzalez-Garcia et al., 2009); sin embargo, la regulación de la expresión del gen *Il7ra* en timocitos tempranos de ratón no se había analizado.

3.3. La vía de señalización IL-7/IL-7R.

La señalización a través del IL-7R se inicia con la unión de la IL-7 a la cadena IL-7R α , lo que provoca el reclutamiento de la cadena γ c y la dimerización de ambas. Como consecuencia de la formación del heterodímero, se activan las quinasas JAK3 y JAK1, asociadas al dominio intracelular de la cadena γ c y de la cadena IL-7R α , respectivamente, que fosforilan residuos tirosina de la porción citoplasmática de IL-7R α , creando un sitio de anclaje para distintas moléculas señalizadoras como STAT5 y PI3-quinasa (PI3K), e induciendo la activación de quinasas MAPK (**Figura 4**) (revisado en Mazzucchelli y Durum, 2007). La activación de estas vías promueve la transcripción de genes diana que incluyen miembros de la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2, ciclina D1, SOCS-1 y c-myc (Leonard, 2001). El mantenimiento de la supervivencia a través de la inducción de Bcl-2 es una de las principales funciones de la señalización mediada por el IL-7R durante el desarrollo T intratímico, ya que la sobre-expresión de

Bcl-2 en ratones deficientes en IL-7R rescata casi por completo la diferenciación T (Maraskovsky et al., 1997), pero no la B (Maraskovsky et al., 1998). La fosforilación de STAT5 por JAK1 y JAK3 resulta en su dimerización y traslocación al núcleo, donde induce la transcripción de distintos genes. La vía de STAT5 se ha asociado principalmente a la diferenciación de timocitos inmaduros (Pallard et al., 1999) y al control de los reordenamientos en los loci del *Tcrg* en células T (Ye et al., 1999; Ye et al., 2001) y del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas o *IgH* (del inglés, *Immunoglobulin Heavy chain*) en células B (Bertolino et al., 2005). La activación de PI3K resulta en la activación de Akt y su diana mTOR, promoviendo la supervivencia celular a través de la degradación de factores pro-apoptóticos como Bad y Bax y el metabolismo celular, a través de la regulación de la expresión de GLUT1 (Pallard et al., 1999; Swainson et al., 2007). Además, la vía de PI3K está involucrada en la progresión del ciclo celular, tanto en células T normales (von Freeden-Jeffry et al., 1997), como en células T leucémicas (Barata et al., 2001), mediante la degradación del inhibidor del ciclo celular $p27^{kip1}$. Por último, la activación de la vía MAPK/ERK, implicada en supervivencia y en la progresión del ciclo celular, tiene lugar en células T leucémicas tras la estimulación con IL-7 (Barata et al., 2004b), pero no en células T fisiológicas (Crawley et al., 1996). Su función biológica en las células leucémicas se desconoce, ya que no parece esencial en el mantenimiento de la viabilidad y proliferación celular mediada por la IL-7 en células normales.

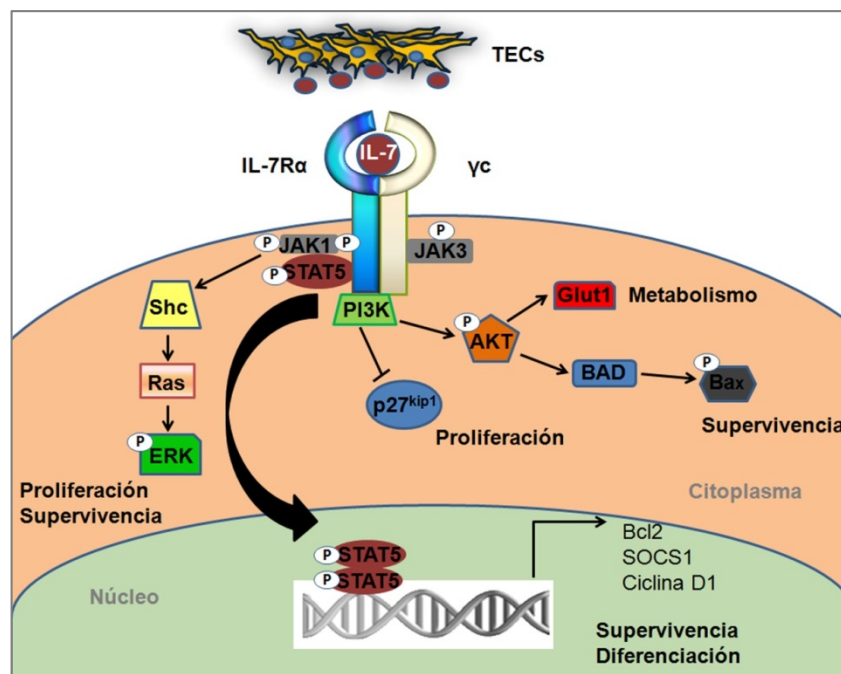


Figura 4. Esquema de la vía de señalización del IL-7R.

4. Función de la señalización a través del pre-TCR durante el desarrollo de los linfocitos T.

El pre-TCR se expresa en el estadio DN3 de la diferenciación intratímica como consecuencia de reordenamientos productivos del *locus Tcrb*. Su composición es similar a la del receptor TCR $\alpha\beta$, de manera que ambos están compuestos por una cadena TCR β asociada de forma covalente con los módulos del complejo CD3 (CD3 ϵ , δ , γ y ζ). Sin embargo, en el pre-TCR, la cadena TCR α es sustituida por una glicoproteína invariante de 33 kDa denominada pre-T α o pT α , que posee un único dominio extracelular tipo inmunoglobulina y un tallo citoplasmático largo (Groettrup et al., 1993). Diversos estudios han mostrado que, mientras que las cadenas CD3 ϵ y CD3 γ son esenciales para la función del pre-TCR, la cadena CD3 δ parece dispensable, y la ausencia de la cadena CD3 ζ únicamente bloquea de forma parcial la función del pre-TCR, poniendo de manifiesto la existencia de diferencias fundamentales con el receptor TCR $\alpha\beta$, que requiere la expresión de todos sus componentes para una correcta señalización (revisado en Michie y Zuñiga-Pflücker, 2002). Sin embargo, el pre-TCR humano posee una composición similar al TCR $\alpha\beta$, habiéndose demostrado la participación de todos los componentes CD3 en la formación del complejo (Carrasco et al., 2001).

Una de las propiedades más características del pre-TCR es la capacidad de señalización constitutiva de este receptor, de manera que la mera expresión del complejo en la membrana es capaz de iniciar la señalización intracelular (O'Shea et al., 1997). Se han propuesto distintos mecanismos para explicar esta capacidad, entre ellos, destaca el hecho de que el pre-TCR se expresa en microdominios de la membrana plasmática ricos en glicolípidos, denominados balsas lipídicas, que proporcionan un entorno señalizador favorable para iniciar la cascada de señalización. En concreto, se ha sugerido que una cisteína del dominio intracelular de pT α próxima a la membrana podría ser palmitoilada, y por tanto, responsable de la localización de pT α en las balsas lipídicas (Saint-Ruf et al., 2000). También se ha demostrado la relevancia funcional del dominio extracelular de pT α en la formación de oligómeros de pre-TCR, que serían esenciales en la inducción de señalización independiente de ligando (Maki et al., 1996).

La señalización a través del complejo pre-TCR, proceso conocido como selección β , constituye el punto de control más importante durante la diferenciación T tras la expansión inducida por el IL-7R, y promueve el cese de los reordenamientos de la cadena β (exclusión alélica), la supervivencia, proliferación y diferenciación de los timocitos hacia el estadio DP. Esta señalización está mediada principalmente por las cadenas CD3, que contienen en su dominio citoplasmático uno o varios motivos ITAM (del inglés: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*), cruciales para la

transducción de señales al interior celular. Los residuos tirosina de los ITAM son fosforilados por las proteínas quinasas de la familia Src, Fyn y Lck (Molina et al., 1992), creando un sitio de anclaje para ZAP70, quinasa de la familia Syk, que es fosforilada y activada (Cheng et al., 1997). A su vez, ZAP70 fosforila las proteínas adaptadoras SLP-76 y LAT (Clements et al., 1998; Pivniouk et al., 1998; Zhang et al., 1999), que sirven de plataforma para distintos adaptadores y moléculas efectoras. Estas interacciones desencadenan la activación de distintas cascadas de señalización, entre las que se encuentran la vía de señalización PLC γ , que resulta en la movilización de calcio y en la activación de PKC y en la consiguiente activación de los factores de transcripción NFAT y NF- κ B, y la vía MAPK/ERK; que median las principales funciones del pre-TCR (**Figura 5**). Aunque su participación en la función del pre-TCR de ratón no ha sido establecida hasta la fecha, nuestro grupo ha demostrado la unión del adaptador CMS al dominio intracelular de pT α humano y su implicación en la señalización del pre-TCR (Navarro et al., 2007). Más discutida ha sido la contribución del dominio intracelular de pT α al proceso de señalización. Aunque los estudios iniciales de nuestro grupo demostrando la implicación crucial de esta región en la señalización inducida por el pre-TCR humano (Carrasco et al., 2001; Navarro et al., 2007) eran contrarios a los datos de ratón que negaban una función específica del tallo de pT α (Fehling et al., 1997), estudios posteriores proporcionaron la confirmación de que esta función se encuentra conservada en ratón (Aifantis et al., 2002).

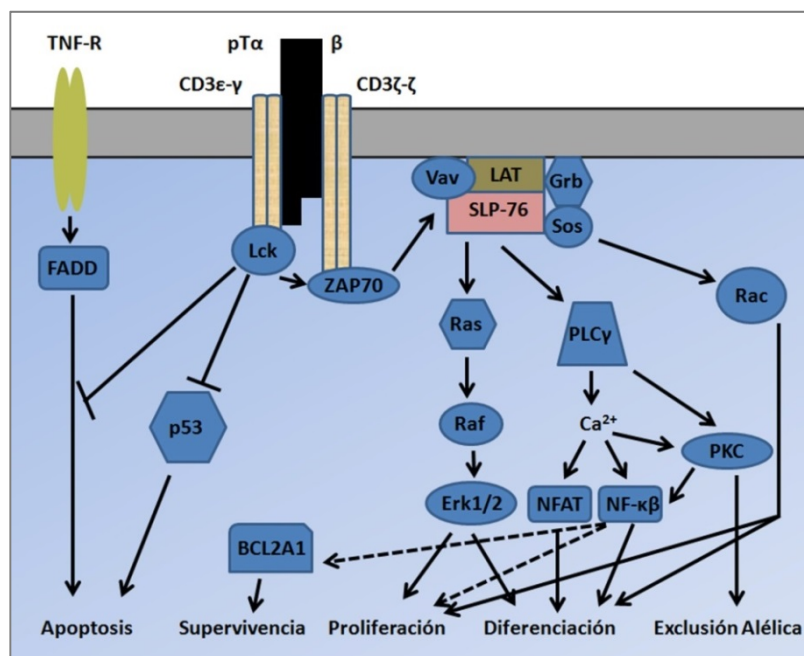


Figura 5. Señalización a través del pre-TCR.

5. Leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL).

La leucemia linfoblástica aguda T o T-ALL (del inglés, *T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*) es un desorden linfoproliferativo caracterizado por la aparición de un alto número de linfoblastos inmaduros en la MO y en sangre, adenopatías y alto riesgo de afectación el sistema nervioso central (Uckun et al., 1997). Aproximadamente entre un 15 y un 25% de los nuevos casos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda en niños y adultos, respectivamente, son de tipo T, e históricamente se han asociado a un peor pronóstico que las de tipo B (Pui et al., 2004). Durante los últimos 20 años se ha mejorado notablemente la supervivencia media de los pacientes con T-ALL, gracias a los avances en el tratamiento con quimioterapia agresiva, de manera que, en la actualidad, el 75-85% de los pacientes pediátricos y el 35-40% de los adultos alcanzan una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo. No obstante, un 20-25% de los pacientes con T-ALL tienen un mal pronóstico, ya que son refractarios al tratamiento inicial o presentan una recaída debido a la resistencia a los medicamentos, lo que se asocia a un alto índice de mortalidad.

La T-ALL se origina en el timo debido a la transformación tumoral de linfocitos T normales durante su desarrollo (Uckun et al., 1997). Análisis citogenéticos permitieron descubrir que aproximadamente el 50% de las T-ALL muestran un cariotipo anormal, con presencia de traslocaciones cromosómicas que implican la juxtaposición de promotores o *enhancers* de los genes del TCR con determinados factores de transcripción como *TAL1*, *LYL1*, *HOX11*, *HOX11L2*, *LMO1* y *LMO2*, dando lugar a la expresión aberrante de estos genes en los timocitos y, en último término, a la transformación oncogénica (revisado en Aifantis et al., 2008). Estas traslocaciones cromosómicas pueden ocurrir durante la diferenciación de los linfocitos T como resultado de reordenamientos ilegítimos del TCR. Aunque las traslocaciones cromosómicas son frecuentes en los pacientes con T-ALL, existe una gran proporción de individuos con cariotipos normales, en los que otros mecanismos son los responsables de la transformación oncogénica. Las alteraciones genéticas más frecuentes dan lugar a mutaciones inactivadoras o deleciones que conllevan la pérdida de factores supresores de tumores como *FBXW7* (Thompson et al., 2007), *PTEN* (Palomero et al., 2007) y *PHF6* (Van Vlierberghe et al., 2010); duplicación génica (Lahortiga et al., 2007); mutaciones de ganancia de función de oncogenes como *NRAS*, o de componentes de vías de señalización como *PI3K/AKT*, *LCK*. Pero existe una muy alta proporción de T-ALL (60%) en las que se han identificado mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1* (Weng et al., 2004), que parecen ser determinantes en la generación de la T-ALL (Pui et al., 1999; Chiang et al., 2008).

5.1. Función oncogénica de Notch1 en T-ALL.

La primera evidencia que asoció la vía de Notch1 con la T-ALL fue el descubrimiento de una traslocación cromosómica poco frecuente (<1% pacientes) t(7;9)(q34;q34.3), que genera una isoforma truncada de Notch1 similar al dominio intracelular activo, y que inicialmente se denominó TAN-1. La transcripción de dicha isoforma está controlada por el *enhancer* del TCR β , altamente activo durante el desarrollo, dando lugar a la sobreactivación de la vía de Notch en los timocitos en desarrollo (Ellisen et al., 1991). La prueba formal de que la señalización aberrante de Notch1 generaba leucemia se obtuvo en modelos de ratón, en los que el trasplante de progenitores hematopoyéticos de MO que sobre-expresaban TAN1 daba lugar a la generación de leucemias T (Pear et al., 1996). Los linfoblastos detectados en estos ratones eran fenotípicamente similares a los encontrados en las leucemias con traslocaciones t(7;9) de pacientes. Mientras que estos estudios mostraron el potencial oncogénico de Notch1, la relevancia de Notch1 en la patogénesis de la T-ALL fue infravalorada durante años, debido a la baja frecuencia de leucemias portadoras de este tipo de traslocaciones. Sin embargo, esta visión cambió por completo en 2004, cuando el grupo de J. Aster demostró que el 60% de los pacientes de T-ALL portan mutaciones activadoras de Notch1, revelando el papel central de Notch1 en esta patología (Weng et al., 2004).

Las mutaciones activadoras de Notch1 se encuentran principalmente en el dominio HD y en el dominio PEST (**Figura 6**). Las mutaciones en el dominio HD exponen el sitio de corte S2, facilitando el corte por ADAM y la activación de la vía en ausencia de interacción con ligando. Las mutaciones en el dominio PEST son pequeñas inserciones o deleciones que resultan en una pérdida total o parcial del dominio, favoreciendo la estabilidad y la vida media de ICN1 debido a un bloqueo en su degradación (Weng et al., 2004). Ambos tipos de mutaciones pueden encontrarse simultáneamente en un mismo individuo y actuar de forma sinérgica, como ocurre en un 15-20% de los casos pediátricos de T-ALL (Weng et al., 2004). Se ha sugerido que estas mutaciones de Notch1 podrían actuar como un evento inicial en la patogénesis de la T-ALL, incrementando la población de progenitores T en riesgo de sufrir mutaciones cooperadoras adicionales, pero que no actuarían como la mutación oncogénica principal, ya que los niveles de activación de Notch1 inducidos por dichas mutaciones activadoras son significativamente menores que los asociados a la traslocación t(7;9) (Eguchi-Ishimae et al., 2008; Chiang et al., 2008). De hecho, la sobre-expresión de estos alelos débiles de Notch en progenitores de MO de ratón no genera leucemia de forma eficiente en los ratones trasplantados, como ocurre cuando se sobre-expresa ICN1, pero sí es capaz de acelerar la leucemia dirigida por otros oncogenes (Chiang et al., 2008; Eguchi-Ishimae et

al., 2008). Sin embargo, estas mutaciones activadoras en Notch1 pueden ocurrir en momentos muy tempranos del desarrollo, incluso en etapas prenatales (Eguchi-Ishimae et al., 2008). Además, se ha descrito que la proliferación y supervivencia de estas T-ALL es estrictamente dependiente de la señalización por Notch1, lo que indica que incluso señales débiles de Notch tienen un papel esencial en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, más allá del mero efecto en la expansión de la población susceptible de sufrir mutaciones (Lin et al., 2006; Chiang et al., 2008).

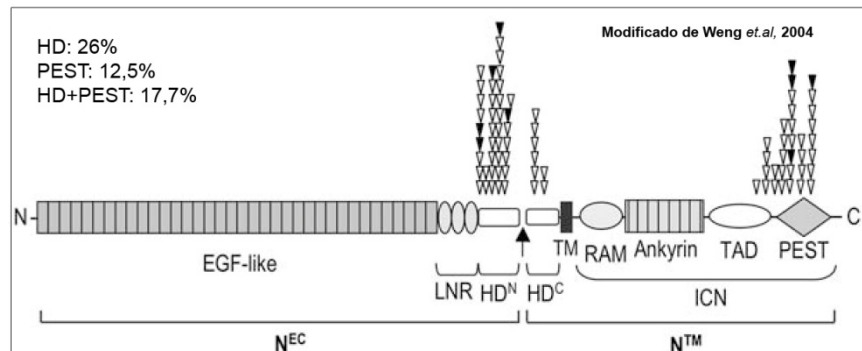


Figura 6. Mutaciones activadoras de Notch1 en la T-ALL humana. Representación esquemática de Notch1 humano que muestra la distribución y frecuencia de las mutaciones en los dominios HD (HD-N y HD-C) y PEST en muestras primarias de T-ALL (puntas de flecha blancas) y en líneas celulares de T-ALL (puntas de flecha negras).

El papel central que desempeña Notch1 en el desarrollo de la T-ALL y la disponibilidad de un modelo de generación de T-ALL dependiente de ICN1 que recapitula la enfermedad en humanos, animó a diferentes grupos de investigadores a estudiar los mecanismos moleculares y celulares a través de los cuales Notch1 ejerce su efecto oncogénico. Inicialmente, varios grupos identificaron c-myc como una diana clave de Notch1 en muestras de T-ALL humanas y de ratón (Palomero et al., 2006b; Weng et al., 2006; Sharma et al., 2006). De hecho, la inactivación condicional de c-myc en células DP leucémicas que sobre-expresan ICN1 previene la formación de tumores en un modelo de ratón, indicando que ambos son necesarios en la patogénesis de la T-ALL (Li et al., 2008). Sin embargo, la sobreexpresión de c-myc no es suficiente para mantener la proliferación tumoral *in vivo* tras la inhibición de la señalización por Notch1, por tanto, Notch1 proporciona señales adicionales necesarias para mantener el tumor (Demarest et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que la ciclina D3 es una diana directa de Notch1 en células leucémicas (Joshi et al., 2009). Este estudio reveló que las quinasas CDK4 y CDK6 también eran dianas indirectas de Notch1 y que, junto con la ciclina D3, rescataban parcialmente la proliferación de líneas celulares humanas de T-ALL tras la inhibición de Notch. De forma complementaria, se demostró que ICN1 requiere la expresión de ciclina D3 para la generación de leucemias *in vivo* (Sicinska et al., 2003).

Hes1, una diana de Notch altamente conservada, es necesaria para la generación y mantenimiento de la T-ALL inducida por ICN1, ya que la eliminación de Hes1 en progenitores de MO que expresan la forma oncogénica de Notch1 da lugar a un retraso en la aparición de la leucemia en los ratones trasplantados, y la delección de Hes1 en una leucemia establecida tiene como consecuencia la desaparición de las células tumorales (Wendorff et al., 2010). El mecanismo a través del cual Hes1 participa en el proceso oncogénico no está claro. Un posible mecanismo sería la represión de PTEN, lo que conduciría a la activación de la vía PI3K/AKT/m-TOR, implicada en la supervivencia y proliferación de las células T (Palomero et al., 2007). La vía de m-TOR también puede ser regulada por Notch1 en leucemias de forma independiente de PI3K/AKT, a través de c-myc (Chan et al., 2007). Además, Notch1 es capaz de promover la supervivencia de las células leucémicas mediante la inhibición del factor supresor de tumores p53, interfiriendo con la vía ARF-mdm2-p53 (Beverly et al., 2005), y a través de la vía PI3K/AKT/m-TOR (Mungamuri et al., 2006). Diversos estudios han sugerido que las proteínas E2A pueden actuar como factores supresores de tumores en las T-ALL y han mostrado que la inhibición de la actividad de E2A es un evento común y crítico en la patogénesis de la T-ALL inducida por Notch1 (Reschly et al., 2006; Li et al., 2008). Por otro lado, la vía de señalización de NF- κ B parece estar activada por Notch1 en la T-ALL y se ha mostrado una cooperación con ICN1 en la generación de la T-ALL en modelos de ratón. Un trabajo posterior mostró que la inducción de la vía NF- κ B por Notch se produce a través del complejo mTORC2 y que dicha activación tiene como resultado la expresión de CCR7 en las células leucémicas (Lee et al., 2012), que se ha implicado en la migración de las células leucémicas hacia otros tejidos (Buonamici et al., 2009). Asimismo, en leucemias humanas que portan mutaciones en Notch1 se ha observado que la vía NF- κ B está activa y que su inhibición reduce eficientemente la proliferación celular *in vitro* (Vilimas et al., 2007). Otra vía de señalización, NFAT, ha sido identificada como un mediador de Notch en leucemias, a través de la activación de la calcineurina, una fosfatasa activada por calcio que es esencial para el procesamiento y la activación de los factores NFAT. El tratamiento de ratones con leucemias dependientes de ICN1 con inhibidores de la actividad de la calcineurina, reduce el tamaño del tumor y prolonga la supervivencia de dichos ratones (Medyouf et al., 2007). Por último, un estudio reciente sugirió que IGF-1R es una diana transcripcional de Notch1 en T-ALL humanas y que los niveles altos de IGF-1R inducidos por Notch, permiten a las células leucémicas responder más robustamente a los niveles fisiológicos de IGF-1/2 favoreciendo así su proliferación (Medyouf et al., 2011). Por tanto, las mutaciones activadoras de Notch1 inducen la transformación celular a través de múltiples vías de señalización que alteran la supervivencia, la proliferación y el metabolismo. Más recientemente, los estudios de nuestro grupo demostrando que el *IL7R* es una diana transcripcional de Notch1, indican que la expresión del IL-7R mediada por Notch1 puede ser un evento crucial en la patogénesis y progresión de la T-ALL.

5.2. Implicación de la IL-7 y del IL-7R en la T-ALL.

Diversos estudios han proporcionado numerosas evidencias de que la IL-7 es esencial no sólo para el desarrollo fisiológico de los linfocitos T, sino que también contribuye a la patogénesis de la T-ALL. De hecho, se sabe que la IL-7 puede actuar como un oncogen *in vivo*, ya que los ratones transgénicos para la IL-7 desarrollan linfomas T y B (Rich et al., 1993). Además, los ratones AKR/J, cuyos timocitos DN sobre-expresan IL-7R α , tienden a desarrollar linfomas T de forma espontánea. La sobre-expresión de IL-7R α en dichos timocitos se asocia a una mayor supervivencia *in vitro* y a una ventaja selectiva en ensayos de trasplante competitivos (Laouar et al., 2004). Por el contrario, ratones transgénicos que sobre-expresan IL-7R α bajo el promotor de CD2 humano y, por tanto, muestran una expresión del transgen específica en células T, presentan una hipoplasia tímica y una reducción del número total de timocitos dependiente de la edad, debido a una competición entre los timocitos DN y DP por las cantidades limitantes de IL-7 en el timo (Munitic et al., 2004).

Diferentes evidencias obtenidas en pacientes con T-ALL sugieren que las señales mediadas a través del IL-7R pueden contribuir al proceso oncogénico. De hecho, las células leucémicas procedentes de pacientes en el momento del diagnóstico frecuentemente expresan IL-7R α (Scupoli et al., 2007; Silva et al., 2011a), y la IL-7 promueve la supervivencia y la proliferación *in vitro* de las T-ALL (Scupoli et al., 2003; Barata et al., 2004a; Scupoli et al., 2007). Más importante, se ha sugerido que la IL-7 puede acelerar la leucemia *in vivo*, ya que el trasplante de leucemias primarias en ratones inmunodeficientes deficientes para IL-7 (*Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}IL-7^{-/-}*) da lugar a una cinética retrasada de aparición de la enfermedad, a una expansión menor de las células tumorales en la MO y a una infiltración reducida en órganos periféricos y, en general, a una mayor supervivencia de los ratones (Silva et al., 2011b). Por último, un trabajo de nuestro laboratorio demostró que la expresión ectópica de IL-7R α puede rescatar la proliferación de células T-ALL *in vitro* tras la inhibición de Notch1 en respuesta a IL-7 (Gonzalez-Garcia et al., 2009). En resumen, estos datos indican que las células leucémicas humanas utilizan el eje IL-7/IL-7R para su expansión *in vitro* e *in vivo* y sugieren una posible cooperación entre Notch1 y el IL-7R en la patogénesis de la T-ALL.

Mientras que estos estudios se centran en el papel del IL-7R como un factor modulador de la progresión de la leucemia, varios trabajos recientes han demostrado la implicación directa del IL-7R como inductor del proceso oncogénico, ya que alrededor del 10% de los pacientes de T-ALL portan mutaciones de ganancia de función en el gen *IL7R*, que actúa como un oncogen (Shochat et al., 2011; Zenatti et al., 2011). La mayor parte de estas mutaciones se encuentran en el exón 6 y crean un residuo de cisteína

desapareado en la región extracelular yuxtamembrana-transmembrana de IL-7R α , que da lugar a la generación de un puente disulfuro entre dos cadenas IL-7R α . Como consecuencia, se forma un homodímero α - α capaz de señalizar de forma constitutiva, independiente de ligando, de manera que, JAK1, STAT5 y AKT se encuentran fosforiladas de forma basal (Zenatti et al., 2011). Otras mutaciones en *IL7R* introducen un residuo de triptófano en la región transmembrana, que se ha implicado en facilitar la formación de homo- o heterodímeros. Ambos tipos de mutaciones se han descrito también en muestras de leucemia linfoblástica aguda B o B-ALL (del inglés, *B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia*), aunque la frecuencia es significativamente menor (0,6%) (Shochat et al., 2011).

Además de las mutaciones en *IL7R* se han detectado mutaciones en las moléculas asociadas a la vía de señalización del IL-7R (revisado en Ribeiro et al., 2013). Las mutaciones somáticas de ganancia de función en *JAK1* son relativamente prevalentes en adultos con T-ALL (18% de los casos) y pueden encontrarse también en un 2% de los casos en niños (Flex et al., 2008). Estas mutaciones normalmente se asocian a un peor pronóstico. Recientemente se han descrito mutaciones de ganancia de función en *JAK3* (Bains et al., 2012). Asimismo, alteraciones genéticas en la vía *PTEN-PI3K-AKT* están presentes en el 48% de los casos, siendo las más frecuentes las de pérdida de función de *PTEN* (Gutierrez et al., 2009).

5.3. Implicación del pre-TCR en la patogénesis de la T-ALL.

Varios estudios han demostrado que el potencial oncogénico de Notch1 es dependiente de la expresión del pre-TCR, ya que ratones reconstituidos con progenitores de MO que expresaban ICN1 sólo generaban leucemia si la expresión del pre-TCR se mantenía intacta (Allman et al., 2001). De mismo modo, la generación de T-ALL en ratones transgénicos para Notch3 es dependiente de la expresión del pre-TCR (Bellavia et al., 2002). Sin embargo, un estudio más reciente ha sugerido que más que un requerimiento absoluto del pre-TCR para generar T-ALL, la señalización mediada por el pre-TCR facilitaría el inicio de la enfermedad (Campese et al., 2006). En relación a las bases moleculares que sustentarían esta cooperación entre Notch y el pre-TCR, se han propuesto dos alternativas que no son mutuamente excluyentes; ambas vías podrían actuar de forma lineal, de manera que una regularía a la otra; o bien actuarían en paralelo, concurriendo en un punto común. Conforme la primera posibilidad, *Ptcra* es una diana transcripcional de Notch1 (Reizis y Leder, 2002), por lo que la expresión de pT α , así como de otros componentes del pre-TCR, como CD3 ϵ y TCR β , estaría directamente controlada por Notch1 (Aifantis et al., 2008). Además, se ha sugerido que

Notch1 promueve la inhibición transcripcional de las proteínas E2A en la T-ALL a través de la regulación de la señalización mediada por el pre-TCR, lo que conduciría a la activación de ERK y a la expresión de los inhibidores de E2A Id1 o Id3 (revisado en Li y von Boehmer, 2011). En el segundo escenario, ambas vías actuarían en paralelo pero convergerían en una o varias señales comunes. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que ambas vías son capaces de activar los factores de transcripción c-myc, NF- κ B y NFAT, y las quinasas LCK, IKK y PI3K, y comparten dianas transcripcionales como la ciclina D3 y BCL-2A1 (revisado en Aifantis et al., 2008). En conclusión, múltiples vías dependientes de Notch y del pre-TCR actuarían de forma sinérgica promoviendo la transformación oncogénica.

5.4. El modelo de célula madre tumoral.

La existencia de las células madre cancerígenas se propuso por primera vez hace más de 40 años, para proporcionar una explicación a la heterogeneidad funcional observada en algunos tipos de tumores (revisado en Wang y Dick, 2005). El modelo propone la existencia de diversos tipos celulares con diferentes capacidades de auto-renovación y proliferación en un mismo tumor, de manera que sólo una pequeña fracción de células, denominadas células madre tumorales o CSC (del inglés, *Cancer Stem Cell*), tiene la capacidad de iniciar el crecimiento tumoral y de reproducir la jerarquía de células que comprende el tumor y regenerar la enfermedad en otro huésped, mientras que la mayoría de las células no son capaces de contribuir al mantenimiento del tumor (células no tumorogénicas). La hipótesis de las células CSC se demostró formalmente en muestras primarias de leucemia mieloide aguda humana, utilizando modelos de xenotrasplante en ratones inmunodeficientes que revelaron la existencia de células poco frecuentes, designadas células iniciadoras de la leucemia o LIC (del inglés, *Leukemia Initiating Cell*). Estas LICs eran capaces de iniciar y mantener la proliferación de la leucemia *in vivo* y estaban comprendidas exclusivamente en la subpoblación más inmadura CD34⁺/CD38⁻ (revisado en Wang y Dick, 2005). Por tanto, las LICs, por definición, poseen al menos dos características distintivas: capacidad de auto-renovación y de generar más LICs, y capacidad de diferenciarse a una progenie con un potencial de auto-renovación limitado. Sin embargo, el concepto de LIC ha evolucionado rápidamente durante los últimos años añadiendo un mayor grado de complejidad al modelo (revisado en Meacham y Morrison, 2013; Kreso y Dick, 2014). En la actualidad se piensa que las LICs pueden encontrarse en subpoblaciones celulares fenotípicamente distintas, incluso en un mismo paciente. Además, diversos estudios sugieren que las LICs pueden ser más numerosas de lo que inicialmente se sospechó, en algunos casos, como el melanoma, del orden de 1 célula en 500 (Quintana et al., 2008). Por último, la población LIC puede mostrar heterogeneidad genómica en un mismo paciente y ésta

puede evolucionar a lo largo de la enfermedad, contribuyendo a la heterogeneidad intratumoral.

La posible existencia de LICs en pacientes de T-ALL fue documentada por primera vez en 2007 (Cox et al., 2007). Este estudio describió que las únicas poblaciones capaces de iniciar una leucemia en ratones NOD/SCID eran poblaciones inmaduras con fenotipo CD34⁺ CD4⁻ (5-10% del total de células leucémicas) o CD34⁺ CD7⁻ (4-6% del total de células leucémicas). En leucemias humanas con mutaciones en Notch1 se ha descrito que las células CD34⁺ muestran mayor potencial de iniciar leucemia que las CD34⁻ (Ma et al., 2012). En relación a las vías de señalización involucradas en la función de las LIC, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han asociado la señalización de la vía de Notch1 con el mantenimiento de la auto-renovación, la supervivencia y la proliferación de las LICs. Un primer estudio reveló que la inhibición de Notch1 abolía la actividad LIC de leucemias primarias humanas *in vivo* (Armstrong et al., 2009). La implicación de Notch1 en la actividad LIC se corroboró en un modelo de leucemia empleando ratones transgénicos para *Tal1* y *Lmo2*, que adquieren mutaciones en *Notch1* de forma espontánea (Tatarek et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento con un anticuerpo humanizado anti-Notch1 de ratones trasplantados con leucemias humanas con mutaciones en Notch1 reduce la supervivencia de las LICs *in vivo* (Ma et al., 2012). Por último, Notch1 protege a las LICs de un potencial daño oxidativo mediante el mantenimiento de bajos niveles de especies reactivas de oxígeno o ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*) dependiente de Runx (Giambra et al., 2012). Estos estudios, en conjunto, sugieren un papel relevante de Notch1 en el mantenimiento y función de las LICs en la T-ALL. Además, otros trabajos han aportado evidencias sobre la implicación de ciertas dianas de Notch en la actividad LIC, como IGF-1R (Medyouf et al., 2011), calcineurina (Gachet et al., 2013) y c-myc (Roderick et al., 2014; Schubbert et al., 2014).

5.5. Implicaciones terapéuticas.

La alta prevalencia de las mutaciones de *NOTCH1* en la T-ALL ha convertido a esta molécula en una diana clave para el tratamiento de esta enfermedad. La inhibición de la señal de Notch1 con inhibidores de gamma secretasa o GSI (del inglés, *Gamma Secretase Inhibitor*) resulta en una rápida disminución de los niveles de ICN1 y de sus genes diana (Weng et al., 2004; Palomero et al., 2006a; Palomero et al., 2006b), que se traduce en un bloqueo de la proliferación y una parada del ciclo celular en líneas celulares derivadas de T-ALL cultivadas *in vitro* (Weng et al., 2003). Estas observaciones dieron lugar a un ensayo clínico en fase I para probar la eficacia del tratamiento oral con GSI en pacientes con T-ALL. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron tan prometedores como

cabía esperar debido a una actividad antitumoral limitada y, sobre todo, a la alta toxicidad gastrointestinal derivada de la inhibición de la función de Notch. El desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento basados en la administración parenteral de GSI, y su uso en combinación con glucocorticoides, como la dexametasona, han permitido bloquear la toxicidad intestinal y ofrecer nuevas oportunidades para el uso de inhibidores de Notch1 como terapia en la T-ALL (Real et al., 2009). Además, un estudio ha sugerido que el uso de GSI junto con inhibidores de m-TOR puede tener un efecto sinérgico, ya que la administración conjunta de GSI y rapamicina inhibe la proliferación de líneas celulares humanas de T-ALL *in vitro* y en modelos de xenotrasplante (Cullion et al., 2009). El uso de anticuerpos monoclonales frente a Notch1 es otra alternativa para bloquear la activación aberrante de Notch1 y disminuir los efectos adversos gastrointestinales causados por la inhibición de los cuatro receptores Notch por GSI. De hecho, actualmente un ensayo clínico (NCT01703572) está evaluando la eficacia y seguridad de un anticuerpo frente a Notch1 en pacientes con neoplasias hematológicas.

El reciente descubrimiento de la presencia de mutaciones de ganancia de función en *IL7R* en pacientes con T-ALL sugiere que la inhibición de la señalización mediada por el IL-7R puede ser una aproximación terapéutica potencialmente útil en el tratamiento de estos pacientes. En esta línea, se ha mostrado que pequeñas moléculas inhibidoras de JAK1 son capaces de eliminar células leucémicas con mutaciones en *IL7R* (Zenatti et al., 2011). Asimismo, estos pacientes tienen una activación constitutiva de la vía de PI3K/AKT/mTOR, por lo que, inhibidores específicos de esta vía pueden ser beneficiosos. Recientemente se ha propuesto una estrategia innovadora dirigida frente al IL-7R basada en el uso de JQ1, un inhibidor farmacológico de las proteínas bromodomain, que disminuye la transcripción del *IL7R* (Ott et al., 2012), pero su potencial antileucémico *in vivo* en leucemias T no se ha estudiado. Por tanto, es necesario desarrollar ensayos preclínicos que exploren la eficacia de terapias dirigidas frente la vía de señalización del IL-7R *in vivo* en el tratamiento de leucemias humanas con mutaciones en *IL7R*. Considerando los antecedentes presentados, la hipótesis de este trabajo es que la función del IL-7R podría contribuir de forma significativa a la patogénesis de la T-ALL inducida por diferentes mutaciones activadoras y, muy particularmente, aquellas dependientes de la vía de Notch1. Por tanto, las terapias específicas dirigidas a la inhibición funcional del IL-7R podrían ser eficaces no sólo en el contexto de las mutaciones activadoras de *IL7R* sino en el contexto general de la dependencia de las T-ALL portadoras de IL-7R no mutados por la IL-7 de su microambiente.

Estas terapias deben observar obligatoriamente el nuevo concepto de CSC, que ha revolucionado en los últimos años el empleo de las estrategias terapéuticas tradicionales basadas en agentes citotóxicos dirigidos a eliminar el conjunto de células del tumor. Como alternativa, se vislumbra el empleo de terapias específicas frente a las

CSC, que son biológica y funcionalmente distintas al resto de células que componen el tumor, y que parecen ser las responsables de la resistencia a los tratamientos y, por tanto, de las recaídas. En el caso concreto de las T-ALL, se ha sugerido que el alto porcentaje de pacientes que presentan recaídas, de hecho, refleja la incapacidad de los tratamientos actuales de eliminar las LIC, por lo que se ha propuesto que la mejor opción terapéutica podría consistir en una combinación de fármacos citotóxicos, que actuarían reduciendo el tamaño del tumor, junto con agentes específicos dirigidos frente a las LIC. En este estudio, proponemos la hipótesis de que la expresión del IL-7R podría ser un marcador de las LIC de la T-ALL, susceptible del diseño de nuevas terapias específicas de mayor eficiencia que las convencionales.

Objetivos ■

El objetivo global de este trabajo de tesis doctoral ha sido analizar la hipótesis de que el IL-7R y pre-TCR, dos receptores implicados en la expansión fisiológica de los progenitores de los linfocitos T, en dos sucesivos estadios de la diferenciación intratímica dependientes de Notch1, deben contribuir a la patogénesis y progresión de la leucemia linfoblástica aguda de tipo T (T-ALL) inducida por mutaciones activadoras de Notch1.

Para ello, hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

- 1. Caracterización de la función que desempeña la señalización mediada por Notch1 en la regulación de la expresión del IL-7R durante el desarrollo intratímico de los linfocitos T de ratón.**
- 2. Estudio de la contribución del IL-7R a la patogénesis y progresión *in vivo* de la leucemia T-ALL dependiente de mutaciones activadoras de Notch1.**
- 3. Análisis de la función de la señalización a través del pre-TCR en la patogénesis de la leucemia T-ALL dependiente de ICN1.**

Materiales y Métodos ■

1. Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo, su fenotipo y su origen se describen en la **Tabla 1**. Los fibroblastos de riñón humano se cultivaron en medio DMEM, y las células Jurkat y las EL4 en medio RPMI 1640 (Lonza), ambos suplementados con antibióticos (penicilina y estreptomycin), 10 mM Hepes (Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen). La línea estromal OP9-GFP y OP9-mDL1 se cultivó en medio α -MEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con antibióticos y 20% de FBS.

| Nombre | Fenotipo | Referencia |
|----------|------------------------------|---------------------------------|
| 293T | Fibroblastos de riñón humano | DuBridge <i>et al.</i> , 1987 |
| EL4 | Linfoma T ratón | Gorer <i>et al.</i> , 1950 |
| Jurkat | T-ALL CD4SP humana | Schneider <i>et al.</i> , 1977 |
| OP9-GFP | Estroma de médula ósea ratón | Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002 |
| OP9-mDL1 | Estroma de médula ósea ratón | Schmitt y Zúñiga-Pflücker, 2002 |

Tabla 1. Relación de líneas celulares empleadas en este estudio. T-ALL: leucemia linfoblástica aguda T.

2. Aislamiento de progenitores hematopoyéticos.

2.1. Progenitores de timo de ratón CD44⁺ CD25⁻ c-kit⁺ (ETP).

La población ETP se obtuvo a partir de ratones C57BL/6 *wild-type* de entre 6 y 8 semanas de edad. La disgregación del timo se realizó mediante compresión mecánica del tejido sobre una malla de nylon de 40 μ m de diámetro de poro. Con el objetivo de eliminar los progenitores más maduros, las células B, los macrófagos y las células mieloides presentes en el timo, la suspensión celular se incubó con una mezcla de anticuerpos biotinilados anti-CD4, CD8, CD25, B220/CD45R, TER-119 y CD11b (**Tabla 2**) en tampón PBS con 1% de FBS y 1% BSA, durante treinta minutos a 4°C. A continuación, se añadieron esferas magnéticas unidas a estreptavidina (Dyna, Invitrogen), y tras 20 minutos de incubación, se procedió a la selección inmunomagnética de la fracción negativa. Los progenitores obtenidos correspondían a las poblaciones intratímicas DN1 (CD44⁺ CD25⁻) y DN4 (CD44⁻ CD25⁻), a partir de las cuales, la población ETP fue purificada en un separador celular (FACS Aria III, BD Bioscience), seleccionando positivamente las células que expresaban los marcadores CD44 y c-kit (**Tabla 2**).

| Especificidad | Conjugado | Clon | Fuente |
|---------------|-----------|----------|-----------------------|
| CD3ε | Biotina | 145-2C11 | B.de Andrés (ISCIII) |
| CD4 | Biotina | Gk1.5 | B. de Andrés (ISCIII) |
| CD8 | Biotina | TIB-105 | B. de Andrés (ISCIII) |
| CD11b | Biotina | M1/70 | B. de Andrés (ISCIII) |
| CD25 | Biotina | PC61.5 | B. de Andrés (ISCIII) |
| CD44 | FITC | IM7 | BD Bioscience |
| CD45R | Biotina | RA3-6B2 | B. de Andrés (ISCIII) |
| CD117 (c-kit) | APC | 2B8 | BD Bioscience |
| GR1.1 | Biotina | RB6-8C5 | B. de Andrés (ISCIII) |
| TER-119 | Biotina | TER-119 | BD Bioscience |

Tabla 2. Listado de anticuerpos utilizados para el aislamiento de progenitores de timo y de MO.

2.2. Progenitores de médula ósea de ratón Lin⁻ c-kit⁺.

Las células de MO se obtuvieron de fémures de ratones de las siguientes cepas: C57BL/6 *wild-type*, transgénicos para IL-7Rα, *knock-out* para IL-7Rα, *knock-in* para C80G y *knock-in* para PRS, de edades comprendidas entre las 6 y 10 semanas de edad. La suspensión medular total se obtuvo mediante inyección a presión de medio BSS con una jeringa de 1 ml y agujas de 30G en los orificios del hueso. A continuación, se eliminaron las células de linaje positivas (Lin⁺) mediante incubación con los anticuerpos biotinilados anti-B220/CD45R, Gr1.1, CD11b, CD3 y TER-119 (**Tabla 2**). Posteriormente, se procedió a la incubación con esferas magnéticas unidas a estreptavidina y selección inmunomagnética negativa. Por último, los progenitores c-kit⁺ se aislaron mediante *sorting* celular seleccionando positivamente las células marcadas con el anticuerpo c-kit (**Tabla 3**).

3. Análisis fenotípico de poblaciones hematopoyéticas por citometría de flujo.

La determinación de marcadores de superficie se llevó a cabo mediante la incubación de las células ($1-2 \times 10^5$) con cantidades saturantes de anticuerpos durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad, en 50 µl de solución de tinción (PBS, 1% FBS, 1% BSA y 0,01% azida sódica). Con el objetivo de bloquear posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos a los receptores FC expresados por distintos tipos celulares, las células procedentes de los bazo, MO e hígados fueron previamente incubadas con el anticuerpo CD16/32 en solución de tinción durante 20 minutos a 4°C. En el caso de tinciones indirectas con estreptavidina (Biolegend), se lavaron los anticuerpos primarios con la solución de tinción y se incubó la estreptavidina de la misma manera. Como

control negativo de tinción se utilizaron anticuerpos irrelevantes del mismo isotipo. Para las tinciones intracelulares, previamente se fijaron y permeabilizaron las células utilizando el tampón CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) durante 20 minutos en oscuridad. Tras las incubaciones, se lavó el exceso de anticuerpo y se analizaron las muestras en un citómetro FACSCalibur (BD Bioscience) o FACSCantoll (BD Bioscience). Los datos fueron analizados posteriormente usando el software FlowJo7.6.5.

| Especificidad | Conjugado | Clon | Fuente |
|----------------------|----------------------|------------|----------------|
| CD3ε | PE | 145-2C11 | BD Bioscience |
| CD3ε | Biotina | 145-2C11 | BD Bioscience |
| CD4 | PE | GK1.5 | BD Bioscience |
| CD4 | PerCP | RM4-5 | BD Bioscience |
| CD8 | FITC | 5H10 | Invitrogen |
| CD8 | PE | 5H10 | Invitrogen |
| CD11b | FITC | M1/70 | BD Bioscience |
| CD11b | PE | M1/70 | BD Bioscience |
| CD16/32 | Sin marcar | 2.4G2 | BD Bioscience |
| CD25 | PerCP | PC61 | Biolegend |
| CD25 | APC | PC61 | eBioscience |
| CD44 | PE | IM7 | BD Bioscience |
| CD45R | PE-Cy5 | RA3-6B2 | Caltag |
| CD90 1.2 | Biotina | 30-H12 | BD Bioscience |
| CD90 1.2 | Pacific Blue | 30-H12 | Biolegend |
| CD117 (c-kit) | FITC | 2B8 | BD Bioscience |
| CD117 (c-kit) | APC | 2B8 | BD Bioscience |
| CD127 (IL-7Rα) | Biotina | A7R34 | eBioscience |
| GR1.1 | PE | RB6-8C5 | BD Bioscience |
| H-2kb | PE | AF6-88.5 | BD Bioscience |
| H-2kb | Biotina | AF6-88.5 | BD Bioscience |
| Fosfo- S6 Ser235/236 | - | Policlonal | Cell signaling |
| Fosfo- ZAP70 Tyr319 | - | Policlonal | Cell signaling |
| TCRβ | FITC | H57-597 | ImmunoTools |
| TCRβ | PE-Cy5 | H57-597 | BD Bioscience |
| TCR γδ | Brilliant Violet 421 | GL3 | Biolegend |
| TCR Vβ 3 | PE | KJ25 | BD Bioscience |
| TCR Vβ 5.1, 5.2 | PE | MR9-4 | BD Bioscience |
| TCR Vβ 8.1, 8.2 | PE | MR5-2 | BD Bioscience |
| TCR Vα 11.1, 11.2 | Biotina | RR8-1 | BD Bioscience |
| TCR Vα 2 | PE | B20.1 | BD Bioscience |

Tabla 3. Relación de anticuerpos utilizados para la detección de antígenos mediante citometría de flujo.

Los anticuerpos utilizados en este estudio para la detección de marcadores celulares por citometría de flujo se recogen en la **Tabla 3**. Todos ellos son de reactividad específica frente antígenos de ratón.

4. Sistema de diferenciación *in vitro* de progenitores hematopoyéticos de timo.

Para el estudio de la diferenciación de los progenitores intratímicos ETP se utilizó el sistema de diferenciación *in vitro* para células T descrito por Zúñiga-Pfückner y colaboradores (Schmitt y Zúñiga-Pfückner, 2002). El sistema consiste en la utilización de una línea celular de estroma de médula ósea de ratón, OP9, modificada genéticamente para expresar en la membrana el ligando de Notch, Delta-like 1 (DL1), lo que permite la generación *in vitro* de células T DP de ratón y humanas. Los precursores intratímicos ETP obtenidos mediante separación celular se co-cultivaron (1×10^4 células/pocillo) sobre una monocapa de estroma al 70-80% de confluencia en placas de 24 pocillos, en medio completo α -MEM (Gibco, Invitrogen) suplementado con 20% de FBS y mezcla estándar de antibióticos penicilina/estreptomicina, en presencia de 200 nM del inhibidor de γ -secretasa, Compuesto E (Alexis Biochemicals, Enzo Life Sciences), o del mismo volumen de dimetil sulfóxido o DMSO (Invitrogen) como control. Para favorecer la diferenciación de células T, se añadieron a los cultivos las citoquinas IL-7 recombinante humano (200 IU/ml, NIBSC) y Flt3l recombinante humano (50 IU/ml, Preprotech). El fenotipo de las diferentes poblaciones se analizó por citometría a diferentes días, previa eliminación de células estromales por filtración con filtros de 70 μ m (Falcon).

5. Ensayos *in vitro* de células leucémicas primarias.

Para los ensayos *in vitro*, las células leucémicas aisladas de bazo de ratones se cultivaron sobre monocapas de estroma OP9-GFP al 70-80% de confluencia en placas de 24 pocillos, en medio completo α -MEM suplementado con 20% de FBS, mezcla estándar de antibióticos penicilina/estreptomicina y IL-7 recombinante humano (200 IU/ml).

5.1. Ensayos de proliferación en respuesta a IL-7.

Con objeto de analizar la contribución del eje IL-7/IL-7R a la proliferación de las T-ALL *in vitro*, se co-cultivaron entre 1×10^5 y 2×10^5 células leucémicas sobre estroma OP9-GFP en presencia de IL-7 recombinante humano (200 IU/ml) o PBS 1X como control, tras dos rondas de lavado con medio sin IL-7. Cada tres días, el co-cultivo celular se

resuspendió y filtró con un filtro de 70 µm y tras el contaje, se plaqueó sobre estroma nuevo y medio fresco.

5.2. Ensayos de proliferación en respuesta a anti-CD3.

Para evaluar la funcionalidad del receptor TCRαβ expresado por las células leucémicas ICN1⁺, se analizó la proliferación celular en respuesta a anti-CD3 (Clon 145-2C11, BD Bioscience) mediante marcaje con Cell Trace™ Violet (Life Technologies). Se pre-trataron pocillos de placas p96 (Costar) con diferentes concentraciones de anti-CD3 (0,1-1-10 µg/ml) durante 16 horas a 4°C. A continuación, las células leucémicas se incubaron con el colorante fluorescente Cell Trace™ Violet en medio sin suero durante 5 minutos a 37°C, seguido de dos rondas de lavado con medio con suero, y se plaquearon 3x10⁵ células por pocillo en la placa p96 pre-tratada con anti-CD3. Posteriormente, se añadió 1 µg/ml de anti-CD28 (BD Bioscience), como co-estímulo, o PBS, como control. Las células se mantuvieron durante 72 horas *in vitro*, tras las cuales se analizó el marcaje con el colorante mediante citometría de flujo. La distribución del colorante fluorescente Cell Trace™ Violet en las células hijas permitió inferir el número de divisiones celulares y calcular la proliferación celular, que se determinó en duplicados. El cálculo del índice de proliferación (IP) se realizó en base a la siguiente fórmula, siendo IFM la intensidad de fluorescencia media:

$$IP = \frac{IFM \text{ de células no proliferadas}}{IFM \text{ de células proliferadas}} \times \frac{100}{\% \text{ Células no proliferadas}}$$

La intensidad de fluorescencia media de las células indivisas (IFM de células no proliferadas) y su porcentaje (% Células no proliferadas) se estableció en la condición de las células cultivadas en ausencia de anti-CD3 y de anti-CD28 y corresponde con el pico de mayor intensidad de fluorescencia. Los picos de menor intensidad de fluorescencia se atribuyeron a células que habían experimentado proliferación (IFM de células proliferadas).

5.3. Análisis de fosforilación de proteínas por citometría de flujo.

Para el estudio de la fosforilación de proteínas en respuesta a estimulación con anti-CD3, las células se mantuvieron durante una hora a 37°C en ausencia de suero. A continuación, se incubaron en pocillos pre-tratados con el anticuerpo anti-CD3 (clon 145-2C11, 10 µg/ml) en placas de p96 (Costar) a 37°C durante 2 o 10 minutos. Como control positivo de la activación, las células se incubaron con 50 µM de pervanadato sódico durante 10 minutos o PBS 1X, como control negativo. La estimulación se paró añadiendo paraformaldehído (PFA) (Sigma) a una concentración final del 2% durante 15

minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fijadas con PFA fueron permeabilizadas mediante incubación en hielo con 0,1% Nonidet P-40 (NP-40) durante 3 minutos. Para la tinción intracelular, las células se lavaron con solución de tinción estándar (PBS 1X, 1% FBS, 1% BSA y 0,01% azida sódica) y se incubaron con los anticuerpos específicos frente a fosfo-Zap70 (Tyr319) y frente a la proteína ribosomal S6 fosforilada (Ser235/236) (**Tabla 3**) durante 16 horas. La tinción de ambos anticuerpos se reveló con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch), que se incubó durante 15 minutos en hielo. La fosforilación de proteínas se determinó en triplicados por citometría de flujo y se expresó como incremento relativo en la intensidad de fluorescencia media (IFM) con respecto a la condición con PBS 1X.

6. Transducciones lentivirales.

La producción de sobrenadantes virales se realizó mediante transfección transitoria por lipofección (jetPEI, Polyplus) de la línea empaquetadora 293T con los siguientes vectores: psPAX2 (gag/pol), pMD2G (envuelta VSV.G) y el vector lentiviral pHRSIN. Para la sobre-expresión de Notch1 se utilizó un vector que codifica para el dominio intracelular de Notch1, ICN1, en el que la expresión de ICN1 y de GFP está controlada por un único promotor, SFFV. Para el silenciamiento de IL-7R α , se utilizaron vectores lentivirales que contenían la horquilla de ARN (shRNA) frente a IL-7R α (shIL7R) o un horquilla control "*scrumble*" (shsc). En este último, el promotor U6 controla la expresión de las horquillas de ARN, y la expresión de GFP está controlada por el promotor SFFV. Se recogieron sobrenadantes 48 y 72 horas después de la transfección y se determinó la eficiencia de transfección (porcentaje de células GFP⁺). Para ello, las células se fijaron con el tampón CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) durante 20 minutos en oscuridad, se realizó un lavado con solución de tinción y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo. A continuación, se calculó el título viral de los sobrenadantes obtenidos mediante infección de células 293T con cantidades decrecientes de sobrenadante. Tras 72 horas se determinó por citometría de flujo la proporción de células transducidas (porcentaje de células GFP⁺). Se eligió la cantidad de sobrenadante que infectaba alrededor del 20% de las células y se calculó el título viral como:

Título viral (Unidades infectivas/ml)

$$= \frac{\text{Nº de células infectadas} \times \text{Frecuencia de células GFP}^+ \times \text{Dilución del sobrenadante}}{\text{Volumen del inóculo (mL)}}$$

Los progenitores de MO o las células leucémicas se infectaron con ratios entre número de unidades infectivas y número de células que variaron entre 10-30 (MOI 10-

30), en una sola ronda de 16-24 horas, en presencia de 50 µg/ml de fibronectina recombinante humana (Retronectin, Takara) y tras centrifugación de 90 minutos a 1.800 rpm a 25°C. Para la transducción de progenitores de MO, las células se sometieron a una estimulación previa con un cóctel de citoquinas durante 4 horas, que incluye SCF de ratón (mSCF, 50 IU/ml), rhFl3tl (50 IU/ml), rhTPO (50 ng/ml, Peprotech), y rhIL-6 (25 IU/ml, NIBSC). En el caso de las células leucémicas, se realizó una estimulación de 16 horas en presencia de rhIL-7 (200 IU/ml). El proceso de transducción se llevó a cabo con las mismas citoquinas empleadas durante la estimulación.

7. Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western blot*.

La fracción proteica celular se obtuvo mediante lisis en tampón RIPA (1% NP-40, 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% SDS en PBS 1X) en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF y 1 µg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina) (Sigma) e inhibidores de fosfatasa (50 mM NaF y 1 mM Na₃VO₄), durante 30 minutos a 4°C. A continuación, los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida (8-12%) en condiciones desnaturalizantes reductoras (SDS-PAGE).

| Especificidad | Origen/Isotipo | Peso molecular | Fuente |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Fosfo-AKT S473 | Conejo (P) | 60 kDa | Cell signaling |
| Akt | Conejo (P) | 60 kDa | Cell signaling |
| Fosfo-ERK1/2 T202/Y204 | Conejo (P) | 42/44 kDa | Cell signaling |
| Erk1/2 | Conejo (P) | 42/44 kDa | Cell signaling |
| Notch1 (C-20) | Cabra (P) | 110 kDa | Santa Cruz |
| Fosfo-STAT5 Y694 | Conejo (P) | 90 kDa | Cell signaling |
| STAT5 | Conejo (P) | 90 kDa | Cell signaling |
| Tubulina | Ratón | 50 kDa | Sigma |

| Especificidad | Conjugado | Origen | Fuente |
|--------------------|------------|--------|-------------|
| IgGs ratón | Peroxidasa | Cabra | Jackson IR. |
| IgGs conejo | Peroxidasa | Cabra | Jackson IR. |
| IgGs cabra | Peroxidasa | Burro | Santa Cruz |

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para *Western Blot*. En la tabla superior se especifican los anticuerpos primarios, y en la inferior los anticuerpos secundarios.

Posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) y se bloquearon con 5% de leche en polvo (Molico Sveltesse, Nestlé) en TBS (TrisHCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM). La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 4 superior**) se realizó en TBS-T 0,1% (Tween 20, Sigma) durante toda la noche a 4°C en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T 0,1% durante 10 minutos, tras los cuales, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (**Tabla 4 inferior**), durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, en TBS-T 0,1% más 5% BSA (Roche). Seguidamente, se sometieron a una reacción de quimioluminiscencia con Lumi-Light Plus (Roche).

8. Generación de vectores y ensayos de detección de actividad luciferasa.

El ADN utilizado para el clonaje del promotor del *Il7ra* se extrajo de timos de ratones adultos C57BL/6 de 6-8 semanas de edad, usando el método fenol/cloroformo descrito previamente (Nolta et al., 1996). Un fragmento de 2.5-kb, que codifica para la región reguladora 5' del gen *Il7ra* de ratón (NM_008372), se amplificó mediante PCR utilizando la enzima ADN polimerasa *Hot Start* (Quiagen) y se clonó en las dianas BglII y MluI del vector reportero de luciferasa *Firefly* pGL3Basic (Promega). Los oligonucleótidos empleados se especifican en la **Tabla 5**.

Para la detección de la actividad luciferasa, se trasfectaron transitoriamente células Jurkat por electroporación (264 V y 975 μ F) con el vector reportero de luciferasa que contiene el promotor del *Il7ra* y los vectores retrovirales MigR1-GFP o MigR1-ICN1, junto con el vector productor de luciferasa de *Renilla Reniformis* prL-CMV (Promega) como control de transfección. La actividad luciferasa del vector y de la *Renilla Reniformis* se determinó en triplicados usando el sistema Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) en un luminómetro Berthold Sirius, y se expresó como inducción relativa con respecto a la transfección con los plásmidos control (pGL3Basic y MigR1-GFP).

9. Inmunoprecipitación de cromatina.

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, se extrajo ADN total de lóbulos tímicos de embriones Swiss de 14,5 días de gestación. Una vez disgregado el tejido y obtenida la suspensión celular, las células se fijaron con 1% PFA (Sigma) a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se paró añadiendo glicina (VWR Chemicals) a una concentración final de 0,125 M. Las células se lavaron con PBS 1X y se lisaron con tampón de lisis (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl y un cóctel de inhibidores de proteasas). A continuación, se fragmentó el ADN genómico de los lisados

celulares mediante sonicación en un baño de ultrasonidos (Bioruptor, Diagenode) durante 20 minutos a máxima potencia, en ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos OFF, y se diluyeron diez veces en tampón de dilución (0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl, 167 mM NaCl e inhibidores de proteasas). Para inmunoprecipitar los complejos ADN-proteína se empleó un anticuerpo monoclonal IgG1 de rata frente a RBPjk (Cosmo Bio) o un anticuerpo monoclonal de rata IgG1 como control (BD Bioscience). Los inmunocomplejos fueron precipitados con proteína G-agarosa (Milipore) durante toda la noche en rotación. Al día siguiente los complejos ADN-proteína se lavaron consecutivamente durante 5 minutos con los siguientes tampones: *Low Salt Wash Buffer* (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl); *High Salt Wash Buffer* (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl); *LiCl Wash Buffer* (0,26 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato sódico, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1) y 1X TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0), y se eluyeron con 0,1 M NaHCO₃ y 1% SDS. Las uniones ADN-proteína se revirtieron mediante tratamiento con 5 M NaCl a 65°C durante 4 horas. El ADN se incubó con 20 mg/ml de proteinasa K (Novagen) durante 1 hora a 45°C y, posteriormente, se extrajo usando el método fenol/cloroformo. El ADN no unido se usó como control de amplificación, y junto con las muestras de ADN inmunoprecipitado se analizaron mediante PCR semi-cuantitativa utilizando la polimerasa *Immolase* (Bioline) con los oligonucleótidos que amplifican el sitio de unión de CSL en los promotores del *Il2ra* o *Il7ra*, detallados en la **Tabla 5**.

| Ensayo | Diana | Secuencia de nucleótidos |
|--|--|--|
| Clonaje promotor <i>Il7ra</i> | Promotor <i>Il7ra</i> | F-5'-AATTTGCCAACACTTGCAATTT-3' R-5'-AGAAGCACGCTTGTATGTGC-3' |
| Inmunoprecipitación de cromatina | Sitio CSL (Promotor de <i>Il7ra</i>) | F-5'-CCCTCCTGTCTTCCCTACCT-3' R-5'-GTGTCCCAGTTCCTCCATTG-3' |
| | Sitio CSL (Promotor de <i>Il2ra</i>) | F-5'-CCAAGAAGTGCTTGCTCACC-3' R-5'-TGGTTTGCGGTAATTTTCA-3' |
| Genotipado de ratones IL-7Rα transgénicos | IL-7Rα transgénico | F-5'-CTGCCAGCCCTCTTCCAT-3' R-5'-TGACTACAGAGATGGTGACAG-3' |

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para el clonaje del promotor del gen *Il7ra*, en los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y para el tipaje de ratones IL-7Rα transgénicos. Se indica el tipo de ensayo, el gen diana frente al que se diseñaron los oligonucleótidos y su secuencia. La letra F se refiere al oligonucleótido sentido y la letra R al oligonucleótido antisentido.

10. PCR cuantitativa a tiempo real.

Para el análisis de la expresión de ARN mensajero mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), el ARN total se extrajo mediante TRIzol (Invitrogen). A continuación, se generó ADN complementario (ADNc) mediante el kit de transcripción reversa de Applied Archive (Applied Biosystems), y la reacción de qPCR se realizó con TaqMan MasterMix y las sondas correspondientes (**Tabla 6**), en un equipo ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

| Gen Diana | Código sonda | Nº acceso GenBank |
|--------------|---------------|-------------------|
| <i>Gapdh</i> | Mm03302249_g1 | NM_008084.2 |
| <i>Il7r</i> | Mm00434295_m1 | NM_008372.4 |

Tabla 6. Sondas TaqMan (Applied Biosystems) utilizadas en el ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real. Se indica el gen diana, el código de la sonda de Applied Biosystems y el número de acceso del ARNm en GenBank.

11. Animales de experimentación.

Los animales empleados en los experimentos fueron indistintamente machos y hembras de 6-10 semanas de edad. La cría de ratones se realizó en condiciones libres de patógenos específicos (SPF, del inglés, *Specific Pathogen Free*) en la Unidad del Animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" y los experimentos de trasplante de progenitores de MO y leucemias en ratones inmunodeficientes se llevaron a cabo en una sala con nivel de bioseguridad 2. Los ratones se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y se les administró agua y dieta estándar *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos del Animalario y del Comité de Ética del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

Los ratones empleados se detallan en la **Tabla 7**. Los fémures de los ratones IL-7R α KO fueron enviados generosamente por la Dra. Anne Corcoran (Babraham Institute, Cambridge), y los fémures de los ratones C80G y KI-PRS fueron proporcionados por el Dr. Balbino Alarcón (Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid). Los ratones transgénicos para IL-7R α fueron cedidos por el Dr. Alfred Singer (National Cancer Institute, Bethesda) y mantenidos en la Unidad del Animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

11.1. Mantenimiento y genotipado de ratones IL-7R α transgénicos.

Debido a que los ratones homocigotos para el IL-7R α transgénico presentan aberraciones cromosómicas, los cruces se realizaron entre un ratón IL-7R α transgénico heterocigoto y uno C57BL/6 *wild-type*, de unas 8 semanas de edad. Para el tipaje de la progenie se extrajo ADN a partir de tejido procedente de la oreja mediante incubación con 50 μ l de tampón de digestión (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl pH 8, 1% SDS) y 10 mg/ml de proteinasa K (Novagen) durante 3 horas a 55°C. A continuación, se añadió 80 μ l de H₂O y las muestras se hirvieron durante 10 minutos. El ADN extraído se amplificó mediante PCR convencional, usando oligonucleótidos específicos para el transgen (**Tabla 5**). En el ensayo de PCR se incluyeron muestras de ADN control para los diferentes genotipos esperados. Posteriormente, los productos de PCR amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los ratones IL-7R α transgénicos se identificaron por la presencia de una banda de 300 pb.

11.2. Modelo de T-ALL en ratones inmunodeficientes.

Para el modelo *in vivo* de T-ALL, se utilizaron indistintamente como huéspedes ratones inmunodeficientes *Rag2*^{-/-} γ c^{-/-} o NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} γ c^{-/-} (NSG) (**Tabla 7**), de edades comprendidas entre las 6 y las 10 semanas, previamente irradiados a una dosis de 1,5 Gy. Para los experimentos de generación de leucemia, los ratones se trasplantaron con 1-2x10⁵ progenitores de MO transducidos con el vector lentiviral PHRSIN-ICN1 o PHRSIN-GFP. En los ensayos de trasplantes seriados, se inyectaron 2x10⁵ células ICN1⁺ por ratón, aisladas de los bazo de los ratones. Para los ensayos de silenciamiento de IL-7R α , las células ICN1⁺ procedentes de los bazo de los primeros huéspedes se sometieron a una segunda transducción con el vector que contiene las horquillas frente a IL-7R α (shL7R) o un shRNA control (shsc). Las células se resuspendieron en PBS 1X a una concentración de 1x10⁶ células /ml y se mantuvieron en hielo. Tras sedar al ratón, se inyectaron 200 μ l de la suspensión celular (0,2x10⁶ células) de manera intravenosa en la vena del seno retro-orbital utilizando jeringas de 0,5 ml y agujas de 30G. La generación de la leucemia se monitorizó mediante examen físico y análisis de sangre periódicos a los ratones. La extracción de sangre de la vena submandibular se realizó mediante punción con una aguja de 23G. Los ratones se sacrificaron usando el criterio de punto final mediante cámara de CO₂ y los linfoblastos presentes en los principales órganos linfoides y no linfoides fueron analizados por citometría de flujo. La identificación de las células procedentes del ratón donante se realizó con anticuerpos frente H-2Kb (**Tabla 3**). La expresión simultánea del marcador H-2Kb y GFP permitió detectar las células transducidas.

| Nombre de la Cepa | Mutación | Fenotipo | Referencia |
|---|------------------|---|-------------------------------|
| C57BL/6 | - | <i>wild-type</i> | The Jackson Laboratory |
| B6.C80G | <i>Knock-in</i> | Mutación en el dominio extracelular de CD3ε. Diferenciación αβ bloqueada | Blanco <i>et al.</i> , 2014 |
| B6.KI-PRS | <i>Knock-in</i> | Mutación en la región citoplasmática de CD3ε. Diferenciación αβ parcialmente bloqueada. | Borroto <i>et al.</i> , 2013 |
| B6.IL-7Rα-Tg | Transgén | Expresión de IL-7Rα bajo el promotor de CD2. Hipoplasia tímica dependiente de la edad. | Yu <i>et al.</i> , 2004 |
| B6.129S7- <i>Il7r</i> ^{tm1Imx} /J | <i>Knock-out</i> | Deficiente en receptor de IL-7Rα. Linfopenia T y B. | Peschon <i>et al.</i> , 1994 |
| FVB/N;B6-Rag2 ^{tm1Fwa} <i>Il2rg</i> ^{tm1Wjl} | <i>Knock-out</i> | Inmunodeficiente. Deficiente en células T,B y NK. | Schotte <i>et al.</i> , 2004 |
| NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid} <i>Il2rg</i> ^{tm1Wjl} /SzJ | <i>Knock-out</i> | Inmunodeficiente. Deficiente en células T,B y NK y sistema inmune innato reducido. | Ishikawa <i>et al.</i> , 2005 |

Tabla 7. Ratones utilizados durante la experimentación.

Resultados ■

1. Relevancia funcional de Notch1 en la regulación de la expresión y función del IL-7R durante el desarrollo fisiológico de los linfocitos T.

La función de Notch1 y del IL-7R es esencial durante el proceso de diferenciación intratímica, tanto de los linfocitos T humanos como de ratón. La señalización por Notch1 se requiere para que los progenitores hematopoyéticos con potencial linfomielóide que llegan al timo procedentes de la MO adquieran la especificación del linaje linfóide T, mientras que la mediada por el IL-7R es necesaria para inducir la proliferación de estos progenitores T intratímicos. Un trabajo previo de nuestro grupo relacionó ambas vías de señalización durante el desarrollo intratímico humano. El trabajo demostró que Notch1 controla la expansión dependiente de la IL-7 de los progenitores intratímicos de los linfocitos T, mediante la regulación transcripcional del gen *IL7R*, que codifica para la cadena IL-7R α del receptor. El estudio reveló que la forma activa de Notch1 consistente en su dominio intracelular (ICN1) se asocia al sitio de unión de CSL, localizado en el promotor del *IL7R*, activando su transcripción. Además, se identificó un sitio de unión de CSL/RBPjk homólogo en el promotor del gen *Il7ra* de ratón, localizado en posición -996 pb desde el inicio de la transcripción (Gonzalez-Garcia et al., 2009) (**Figura 7A**), lo que sugería la asociación funcional de Notch y el IL-7R también en ratón. Sin embargo, esta posible asociación no se había descrito y su relevancia era desconocida, por lo que nos propusimos determinar si el mecanismo molecular por el que Notch1 activo regula temporalmente la expresión y función del IL-7R durante el desarrollo intratímico humano estaba conservado en ratón.

1.1. *Il7ra* es una diana transcripcional de Notch1.

Para determinar si Notch1 activo se asocia al posible sitio de unión identificado en el promotor del gen *Il7ra*, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos anti-RBPjk (ortólogo de CSL) en timocitos primarios procedentes de ratones de 14,5 días de gestación. Las células presentes en el timo en este estadio del desarrollo embrionario son en su totalidad progenitores DN; por lo que la mayor parte expresan niveles altos del IL-7R y tienen la vía IL-7/IL-7R activa (Shortman et al., 1990; Sudo et al., 1993). Tras la inmunoprecipitación, se llevaron a cabo ensayos de amplificación del ADN mediante PCR que revelaron un enriquecimiento selectivo en fragmentos de ADN que contienen el sitio CSL putativo en el promotor del *Il7ra*, enriquecimiento similar al observado en ensayos control dirigidos al promotor del gen diana de Notch1 *Il2ra*. Por tanto, podemos confirmar que Notch1 interacciona *in vivo* con el promotor del *Il7ra* de ratón a través de RBPjk (**Figura 7B**).

RESULTADOS

Con el fin de determinar la funcionalidad de esta interacción, analizamos la inducción del promotor del *Il7ra* por Notch1 en ensayos de activación de la transcripción, usando vectores de expresión de luciferasa (pGL3Basic) que contienen un fragmento de 2.5-kb que codifica para la región 5' reguladora del gen *Il7ra* que incluye el sitio CSL/RBPjk identificado. Para ello, se co-transfectaron células Jurkat con este vector y con el vector retroviral que codifica para la forma activa de Notch1, ICN1 (MigR1-ICN1), o con el vector retroviral vacío como control (MigR1). En las células co-transfectadas con ICN1 y el vector que contiene la región reguladora del *Il7ra* se observó un incremento significativo de la actividad luciferasa (2,6 veces) con respecto a las co-transfectadas con el vector control, lo que demuestra la activación transcripcional del *Il7ra* por ICN1 (**Figura 7C**). Estos datos en conjunto demuestran que el gen *Il7ra* de ratón es una diana transcripcional de Notch1.

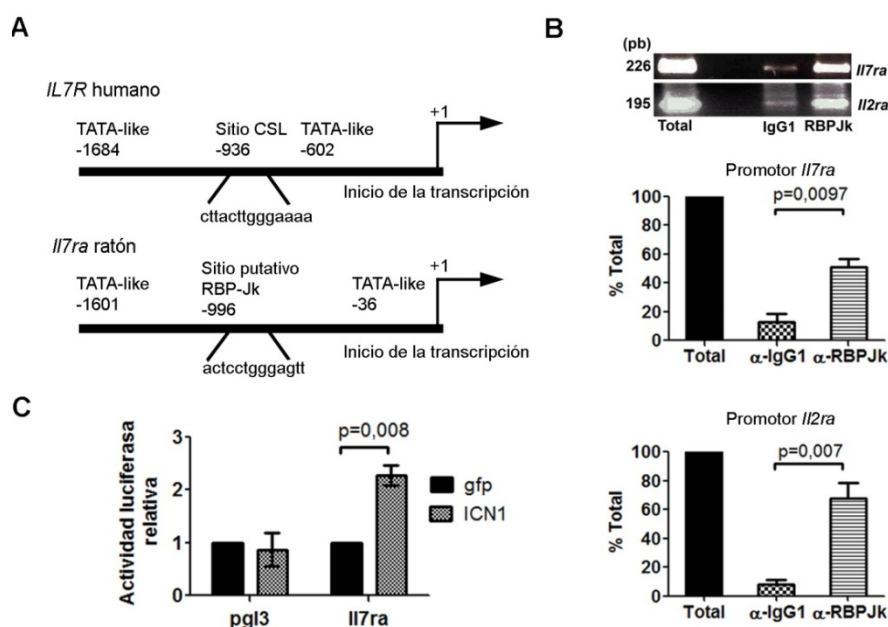


Figura 7. Notch1 regula la transcripción del gen *Il7ra* de ratón. (A) Esquema de la región reguladora 5' del promotor del *IL7R* humano y de ratón. Se indica el sitio de unión de CSL en el promotor humano y el sitio putativo RBPjk conservado en el promotor de ratón. Los números indican la distancia en pares de bases desde el inicio de la transcripción. (B) En la parte superior, inmunoprecipitación de cromatina de timocitos de ratón DN con anticuerpos anti-RBPjk. Se utilizaron anticuerpos control anti-IgG1 de rata. La PCR se realizó sobre ADN total o sobre el ADN inmunoprecipitado, utilizando oligonucleótidos específicos para el sitio RBPjk en *Il7ra* y *Il2ra*. Las gráficas inferiores muestran la cuantificación (% del total) del enriquecimiento en fragmentos de ADN que contienen el sitio RBPjk en el promotor del *Il7ra* (superior) o en el promotor del *Il2ra* (inferior), tras la precipitación con anticuerpos control (α -IgG1) o anti-RBPjk. Los datos están relativizados al 100% del ADN total. (C) Ensayos de expresión de luciferasa en células Jurkat transfectadas con ICN1 o GFP, junto con el vector pGL3 control (pgl3) o el que contiene la región reguladora del *Il7ra* mostrada en A (*Il7ra*). Los datos representan la inducción de la actividad luciferasa en relación a las células transfectadas con los vectores pGL3 y GFP vacíos. En B y C las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se indica la significación estadística de los resultados.

1.2. La activación de Notch1 regula la expresión temporal del IL-7R durante la diferenciación intratímica de los linfocitos T de ratón.

Durante el proceso de la diferenciación intratímica de ratón, la cadena IL-7R α del IL-7R se expresa por primera vez en progenitores ETP en tránsito hacia el estadio DN2, y es en este estadio donde el IL-7R ejerce su función más importante: la promoción de la supervivencia y de la proliferación de los timocitos DN2, que tiene como finalidad amplificar la población de células pro-T que serán objeto de los reordenamientos en el *locus Tcrb* y, posteriormente, de la selección β (Sudo et al., 1993; Peschon et al., 1994; von Freeden-Jeffry et al., 1995). A partir del estadio DN3, la expresión del IL-7R disminuye paulatinamente hasta el estadio DP, cuando desaparece de la membrana (Munitic et al., 2004; Yu et al., 2004; Yu et al., 2006). La expresión de Notch1 sufre una regulación paralela a la del IL-7R durante el desarrollo intratímico, siendo alta en los estadios DN, y disminuyendo en células DP (Hasserjian et al., 1996). El perfil de expresión similar que presentan Notch1 y el IL-7R durante los primeros estadios de la diferenciación intratímica (Taghon et al., 2006) (**Figura 8A**), y el hallazgo de que *Il7ra* es una diana transcripcional de Notch1 también en ratón, sugieren que la activación de Notch1 podría ser crucial en la regulación diferencial de la expresión del IL-7R durante el desarrollo de los linfocitos T de ratón. Para analizar esta posibilidad, decidimos estudiar si la inactivación de Notch1 podría alterar el patrón de expresión del IL-7R y la capacidad proliferativa de los progenitores intratímicos durante su diferenciación. Con este fin, se realizaron co-cultivos de progenitores intratímicos tempranos o ETP sobre células estromales OP9 de MO de ratón que expresan de forma ectópica el ligando de Notch1 DL1 (OP9-DL1). Este sistema induce la activación de Notch1 y recapitula los diferentes estadios de diferenciación T (**Figura 8B**) que determinan la generación de timocitos CD4⁺ CD8⁺ DP con receptores TCR $\alpha\beta$ -CD3 maduros a partir de los progenitores ETP (Zuñiga-Pflücker, 2004). Para bloquear la activación de Notch1, los cultivos se suplementaron con un inhibidor farmacológico de las γ secretasas (GSI), que son esenciales para la activación de Notch, denominado Compuesto E (200 nM), y utilizamos DMSO en los cultivos control. Los progenitores ETP se aislaron de timos de ratones C57BL/6 adultos (6-8 semanas de edad) tras una eliminación rigurosa de timocitos DP y SP, células B, células dendríticas y progenitores DN2 y DN3, y una posterior separación celular por *sorting* en base a la expresión de los marcadores CD44 y c-kit, como se ha descrito en *Materiales y Métodos*. La **Figura 8C** muestra la población de timocitos ETPs, que representan alrededor de un 0,01%-0,02% del total de timocitos (Porritt et al., 2004), y se caracterizan por expresar CD44 y c-kit (CD44⁺ CD25⁻ c-kit⁺) y niveles negativos o intermedios de IL-7R α (**Figura 8D**), y se consideran los progenitores canónicos de las células T (Porritt et al., 2004).

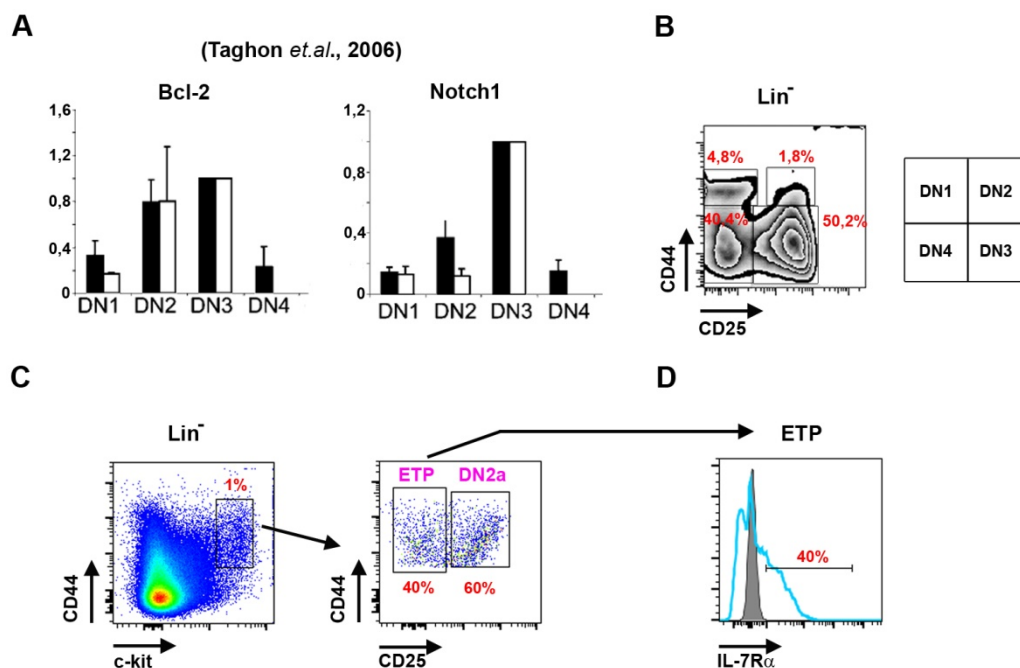


Figura 8. Poblaciones DN en el timo de ratón adulto. (A) Patrón de expresión génica de una diana del IL-7R (Bcl-2) y de Notch1 durante los estadios DN del timo de ratón (barras negras), determinado mediante RT-PCR cuantitativa. (B) Tras la eliminación de células positivas para marcadores de diversos linajes intratímicos no-T (B, NK, DCs) y de timocitos maduros (CD4/CD8 SP, DP), los timocitos DN de ratones C57BL/6 se incubaron con anticuerpos anti-CD44 y anti-CD25, cuya expresión diferencial define las distintas poblaciones DN (derecha). Los números indican el porcentaje de cada población DN (izquierda). (C) Expresión de CD44 y c-kit en los progenitores DN (izquierda) e identificación de la población de progenitores intratímicos tempranos o ETP, definida como c-kit⁺ CD44⁺ CD25⁻ (derecha). (D) Expresión de la cadena α del IL-7R en la población ETP. El histograma sombreado representa la tinción con un anticuerpo isotípico control. Los números indican el porcentaje de células positivas.

Los ETP recién aislados se pusieron en cultivo sobre una monocapa de células estromales OP9-DL1 con el objetivo de estudiar su cinética de diferenciación y determinar la expresión del IL-7R durante los distintos estadios madurativos y su posible modulación por Notch1. Tras cinco días de cultivo, los timocitos control suplementados con DMSO se diferenciaron mayoritariamente (72%) al estadio DN2 (CD44⁺ CD25⁺) y, algunos (27%) habían progresado hasta el estadio DN3 (CD44⁻ CD25⁺) tras perder la expresión de CD44, para dar lugar a células DN4 y DP a día 12. A día 15, casi la totalidad de las células habían alcanzado el estadio DP y expresaban en su membrana el complejo TCRαβ maduro (**Figura 9A**). A semejanza de lo que ocurre *in vivo* durante el proceso de diferenciación intratímica, los timocitos proliferaron extensamente durante los primeros 5-8 días de cultivo, coincidiendo con la generación de los estadios DN1-DN3, y con una mayor expresión de IL-7Rα (**Figura 9A, B, C y D**), que fue disminuyendo a medida que las células progresaban a lo largo de la diferenciación y alcanzaban el estadio DP (**Figura 9A, C y D**).

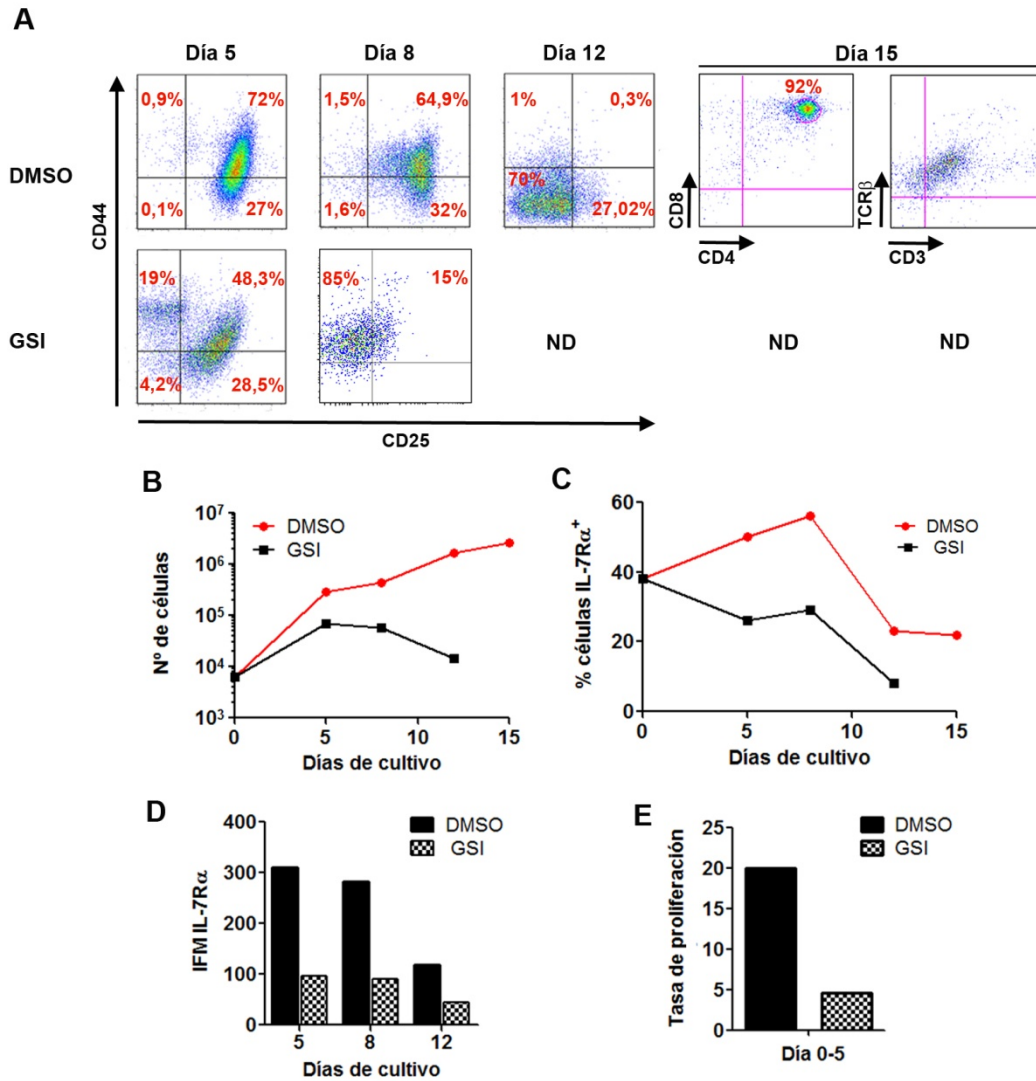


Figura 9. Notch1 controla la proliferación de los timocitos DN a través de la regulación de la expresión de IL-7Rα. (A) Citometría de flujo de CD44 vs. CD25, CD4 vs. CD8, y TCRβ vs. CD3 en timocitos ETP cultivados a distintos tiempos sobre células estromales OP9-DL1 en presencia de 200 nM de GSI o DMSO como control. Los números de los cuadrantes representan los porcentajes de células positivas. N.D. no determinado debido a la baja recuperación celular. (B) Números totales de timocitos recuperados a los días indicados, normalizados para $6,5 \times 10^3$ células iniciales. (C) Porcentaje de células IL-7Rα⁺ a lo largo de los cultivos suplementados con DMSO o GSI, determinado por citometría de flujo. (D) Intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de IL-7Rα en los timocitos en cultivo. (E) Tasa de proliferación de los timocitos durante los primeros 5 días de cultivo (Número de timocitos a día 5/Número de timocitos a día 0) en presencia de DMSO o GSI, normalizado para $6,5 \times 10^3$ células iniciales.

RESULTADOS

El patrón de diferenciación observado se alteró notablemente en los cultivos tratados con GSI. Si bien la mayor parte de las células (76,7%) se diferenciaron al estadio DN2-DN3 tras cinco días en cultivo, los niveles de expresión de CD25, que es una diana transcripcional de Notch, eran significativamente menores que los de células DN2 control (**Figuras 9A**). Más importante, observamos que el tratamiento con GSI resultó además en la disminución de la expresión del IL-7R (**Figura 9C y D**) y en una reducción significativa de la proliferación asociada a los estadios DN2 (**Figura 9B y E**). A día ocho, sólo pudimos detectar una población CD44⁺ CD25⁻ que, a juzgar por la expresión del marcador Thy1.2, parecía corresponder con timocitos bloqueados en el estadio DN1 (**Figura 9A** y Datos no mostrados). En consecuencia, en estos cultivos sólo se recuperó una población de células CD44⁺ CD25⁻ positivas para el marcador Thy1.2, que desaparecieron a días posteriores, sin observarse generación de timocitos DP (**Figura 9A** y Datos no mostrados). Este bloqueo de la diferenciación se correlacionó directamente con una reducción significativa de la proliferación celular (**Figura 9B y E**) y de los niveles de expresión de IL-7R α (**Figura 9C y D**), que se mantuvieron reducidos a lo largo del cultivo.

En resumen, la inhibición de la señalización por Notch tiene como consecuencia la disminución de la expresión de IL-7R α , lo que apoya la hipótesis de que el gen *Il7ra* es una diana transcripcional de Notch1 en ratón. Además, en ausencia de activación de Notch, la supervivencia y la proliferación de los timocitos DN1-DN3 se ve drásticamente reducida de forma paralela a la disminución de la expresión del IL-7R, y se produce un bloqueo de la diferenciación en el estadio DN1. Estos datos sugieren que Notch1 es esencial no sólo para la progresión de los precursores intratímicos a lo largo del linaje T, sino también para la proliferación de los progenitores pro-T, y que esta función se realiza, al menos en parte, mediante la inducción de la expresión del gen que codifica para la cadena IL-7R α , que se asocia con la cadena constitutiva γc para formar el IL-7R.

2. El potencial leucemogénico de Notch1 es dependiente de la función del IL-7R.

Notch1 no sólo desempeña un papel crucial en el desarrollo de los linfocitos T, sino que, además, la activación aberrante de Notch1 da lugar a la transformación oncogénica de los progenitores intratímicos durante su desarrollo y a la generación de leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL). El papel central de Notch1 en la patogénesis de la T-ALL se puso de manifiesto en 2004, cuando el grupo de John Aster describió que más del 60% de las T-ALL humanas portan mutaciones activadoras de Notch1 (Weng et al., 2004). Diversos estudios realizados en modelos de ratón han permitido conocer algunos de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de estas leucemias T-ALL. En concreto, se ha demostrado la participación en el proceso oncogénico de las principales dianas de Notch1 relacionadas con vías de señalización que controlan la supervivencia y proliferación celular durante la diferenciación de los linfocitos T, tales como c-myc, ciclina D3, pT α , Hes1 o NF- κ B. Además, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que Notch1 regula no sólo la expresión fisiológica de IL-7R α durante el desarrollo en el timo humano, sino también la expresión en líneas de leucemia T-ALL humana (Gonzalez-Garcia et al., 2009). De hecho, nuestros datos y los de otros grupos indican que esta expresión es funcional, ya que gran parte de las T-ALL humanas responden a IL-7 y utilizan la vía IL-7/IL-7R para su proliferación *in vivo*, lo que sugiere la implicación del IL-7R en la progresión de la leucemia (revisión en Ribeiro et al., 2013). Considerando todos estos datos, nuestra hipótesis es que el IL-7R podría activar vías de señalización adicionales a las inducidas por Notch1, que podrían contribuir de forma crítica no sólo a la progresión tumoral, sino también al proceso oncogénico iniciado por Notch1. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar directamente esta posibilidad y determinar la posible implicación de Notch1 en la regulación de la expresión de IL-7R α en situaciones patológicas, en concreto durante el proceso de inducción de la T-ALL dependiente de la activación aberrante de Notch1, así como caracterizar la función del IL-7R en la generación y/o en el mantenimiento de las T-ALL. Este tipo de estudios demanda la generación de modelos animales en los que la manipulación del proceso de diferenciación intratímica conduzca a la generación *in vivo* de una T-ALL.

2.1. Generación *in vivo* de leucemias T-ALL por la activación constitutiva de Notch1.

El grupo del Dr. Warren Pear describió en 1996 un modelo de generación de leucemia T-ALL en ratón que recapitula la enfermedad humana (Pear et al., 1996) y que, desde entonces, ha sido de gran utilidad para identificar múltiples dianas de Notch1, así

como vías de señalización implicadas en la patogénesis de la T-ALL. En este modelo, el proceso oncogénico es inducido por la expresión ectópica de la forma activa de Notch1, consistente en el dominio intracelular ICN1 del receptor. La transducción de progenitores hematopoyéticos de la MO con vectores retrovirales portadores de ICN1, induce la expresión constitutiva de Notch1 activo en dichos progenitores que, al ser trasplantados en ratones BALB/c irradiados, dan lugar a la generación de la leucemia T-ALL con una latencia de 9-11 semanas (Pui et al., 1999; Demarest et al., 2011). Para estudiar el papel del IL-7R en la patogénesis de la T-ALL dependiente de ICN1 decidimos hacer uso de este modelo introduciendo algunas modificaciones (**Figura 10A**). Con el objetivo de disponer de una población homogénea de progenitores, aislamos por separación celular (*sorting* electrónico) las células c-kit⁺ contenidas en la población progenitora Lin⁻ (negativa para marcadores de linajes hematopoyéticos maduros) procedente de la MO de ratones C57BL/6. Las células Lin⁻ c-kit⁺ representan la población de progenitores más tempranos de la MO del ratón (**Figura 10B**). Estos progenitores se transdujeron con un vector bicistrónico lentiviral que codifica para ICN1 y GFP y, tras 16 horas de cultivo, las células recuperadas (ICN1⁺ e ICN1⁻) se trasplantaron por inyección intravenosa en ratones inmunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) o Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}. Para descartar un efecto inespecífico de la transducción lentiviral sobre la transformación oncogénica, utilizamos como control un grupo de ratones trasplantados con progenitores de MO transducidos con el vector lentiviral conteniendo sólo GFP.

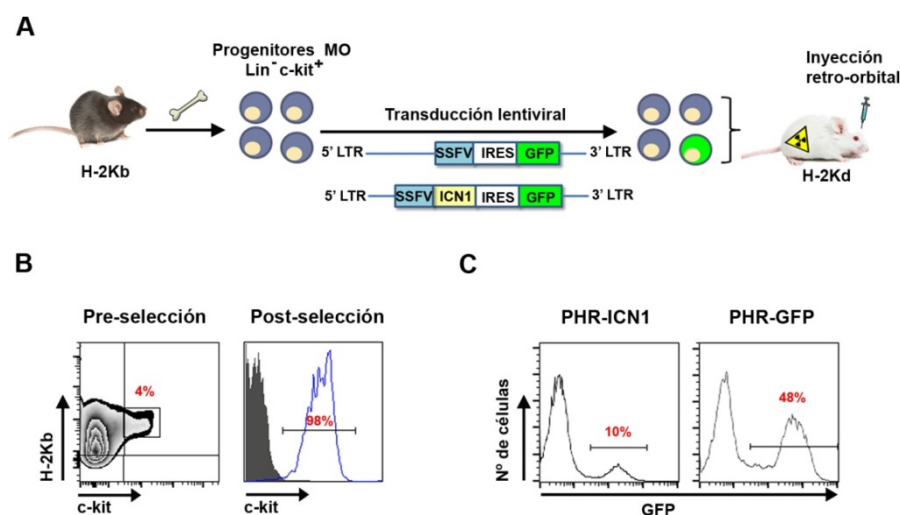


Figura 10. Modelo de generación de leucemias T-ALL inducidas por ICN1 en ratón. (A) Esquema del modelo de generación de T-ALL en ratón. (B) Expresión en membrana de c-kit en progenitores de la MO antes y después de la separación celular, analizada por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células positivas. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotópico irrelevante. (C) Eficiencia de transducción (% de células GFP⁺) de los progenitores Lin⁻ c-kit⁺ infectados con el vector lentiviral que codifica para ICN1 y GFP (PHR-ICN1) o con el vector control (PHR-GFP).

La identificación de las células procedentes de los ratones donantes se llevó a cabo mediante citometría de flujo, analizando la expresión diferencial del haplotipo H-2K por las células trasplantadas (H-2Kb) con respecto a las células del huésped (H-2Kd). La expresión de GFP permitió identificar y cuantificar la contribución de las células transducidas a la reconstitución de los animales tras el trasplante. Las eficiencias de la transducción fueron variables y, en general, <10% para ICN1 (ICN1⁺) y >45% para los vectores vacíos (GFP⁺) (**Figura 10C**). El análisis de la MO de los animales trasplantados con el vector control reveló un potencial de reconstitución similar de las células transducidas (GFP⁺) y no transducidas (GFP⁻) a 5 semanas post-trasplante, con la distribución esperada de células mieloides, linfocitos B y ausencia de linfocitos T (**Figura 11A**). Por el contrario, la expresión constitutiva de ICN1 indujo un bloqueo significativo de la diferenciación mieloide y de la generación de linfocitos B en la MO, acompañado del desarrollo ectópico de células T en la MO (**Figura 11B**), de forma idéntica a los estudios descritos previamente utilizando vectores retrovirales. Dos semanas después del trasplante, la mayor parte de las células ICN1⁺ de la MO ya expresaba un fenotipo aberrante CD4⁺ CD8⁺, similar al de los timocitos DP, con la excepción de su localización extratímica. Por el contrario, las células no transducidas (ICN1⁻) eran negativas para marcadores del linaje T, pero habían generado linfocitos B y células mieloides (**Figura 11C y Datos no mostrados**). Además de su fenotipo aberrante, las células ICN1⁺ también mostraron una capacidad proliferativa significativamente incrementada (>300 veces) en comparación con las células no transducidas (**Figura 11D**). De hecho, a pesar de ser la población minoritaria en el momento del trasplante (alrededor de un 6% del total de las células H-2Kb⁺), dos semanas después, las células ICN1⁺ representaban más del 50% del total de las células trasplantadas, convirtiéndose en la población dominante (>90%) a semana 3 (**Figura 11E**). En efecto, las células ICN1⁺ constituían más del 60% del total de las células de la MO (H-2Kb⁺ y H-2Kb⁻) a semana 5 post-trasplante en la mayoría de los ratones analizados (Datos no mostrados). A partir de semana 4, los animales mostraron signos de enfermedad y se hizo evidente la aparición de leucemia con una penetrancia del 100% y una supervivencia media de 34 días (**Figura 11F**), tiempo significativamente menor que en los trabajos previos en los que se emplearon ratones BALB/c como receptores (Pui et al., 1999; Demarest et al., 2011).

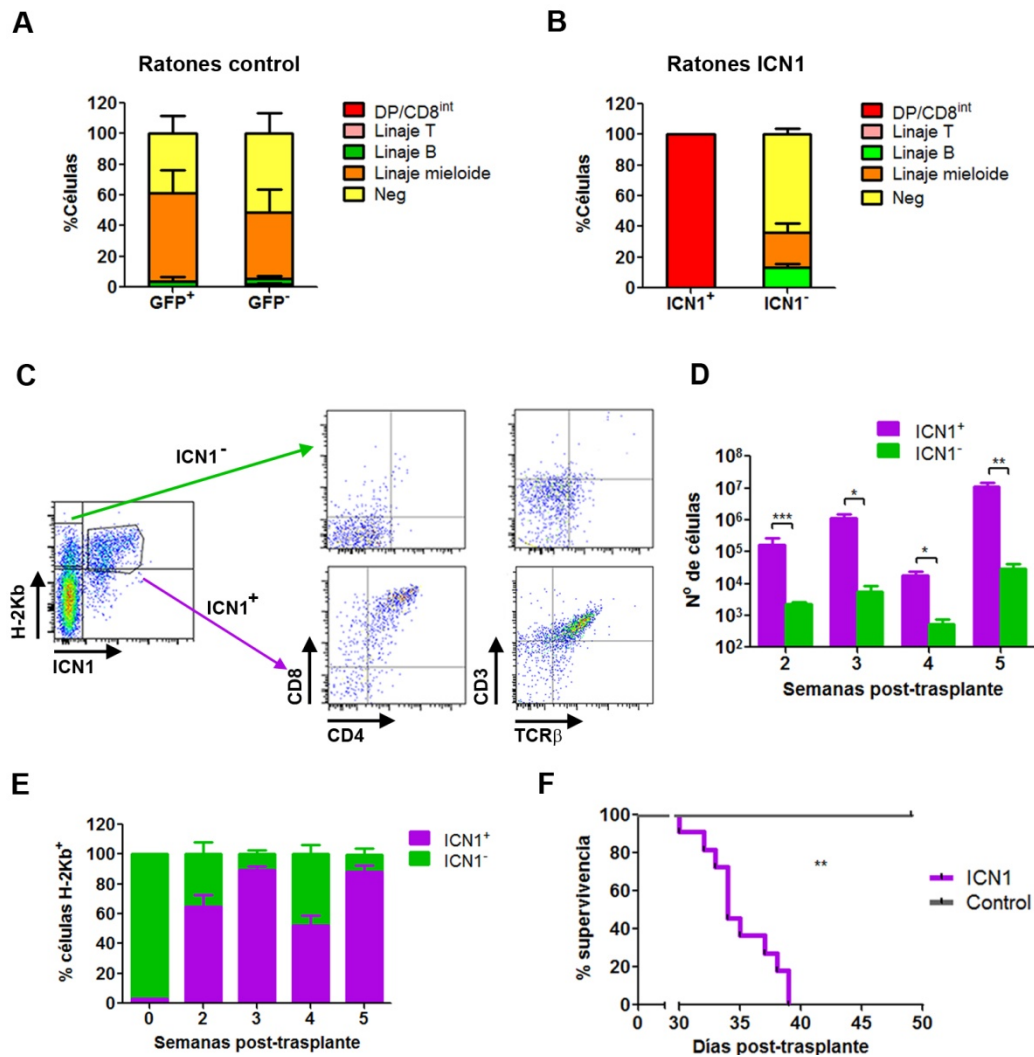


Figura 11. Generación extratímica de células T DP en la MO de ratones trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ que sobre-expresan ICN1. (A) Linajes mayoritarios de las células GFP⁺ y GFP⁻ detectadas a semana 5 post-trasplante en la MO de ratones trasplantados con progenitores de MO de ratones H-2Kb⁺ transducidos con el vector lentiviral control conteniendo sólo GFP. Neg significa negativo para los marcadores estudiados (CD4, CD8, B220, CD11b). (B) Linajes mayoritarios de las células ICN1⁺ e ICN1⁻ detectadas a semana 5 post-trasplante en la MO de ratones trasplantados con progenitores de MO de ratones H-2Kb⁺ transducidos con el vector lentiviral que codifica para ICN1 y GFP. Neg significa negativo para los marcadores empleados (CD4, CD8, B220, CD11b). (C) Análisis por citometría de flujo del fenotipo de las células ICN1⁺ e ICN1⁻ detectadas a 2 semanas post-trasplante en la MO de ratones trasplantados con progenitores de MO de ratones H-2Kb⁺ transducidos con vectores portadores de ICN1. (D) Números totales de células H-2Kb⁺ ICN1⁺ vs. ICN1⁻ recuperadas a los tiempos indicados de la MO de los ratones trasplantados. Los números están normalizados para 3x10³ células iniciales. (E) Porcentajes de las poblaciones ICN1⁺ e ICN1⁻ relativizados al 100% de las células H-2Kb⁺ presentes en la MO a distintos tiempos post-trasplante. En D y E las barras representan la media ± SEM de al menos 3 ratones. (F) Curva Kaplan-Meier de supervivencia de los ratones trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ transducidos con ICN1 con respecto al grupo de ratones control. En D y F se muestra la significación estadística de los datos (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Dos semanas después del trasplante también se detectó una población ICN1⁺ en el bazo, que suponía el 50% del total de las células H-2Kb⁺ del donante y que sufrió una cinética de expansión similar a la de las células ICN1⁺ de la MO (**Figura 12A**). A partir de semana 5, las células ICN1⁺ infiltraron también el hígado y timo, coincidiendo con el momento en el que la supervivencia de los ratones se vio comprometida (**Figura 12B y C**). En este momento, la mayor parte de los ratones presentaban esplenomegalia y hepatomegalia acusada como consecuencia de la expansión masiva de las células leucémicas, y en algunos casos, además, infiltrados macroscópicos en el hígado (**Figura 12D**). Por el contrario, los ratones trasplantados con células transducidas con el vector control permanecieron sanos durante al menos 18 semanas, sin mostrar ninguna característica típica de la T-ALL, aunque se identificaron células GFP⁺ del donante a semana 5 post-trasplante en el bazo (alrededor del 10% del total de células H-2Kb⁺) y timo (<5%), pero no el hígado (Datos no mostrados). Como era de esperar, las células del bazo de los ratones control eran mayoritariamente células B, y en menor medida células mieloides y células T maduras SP, y mostraban una distribución similar a la que presentaban las células control no transducidas GFP⁻ (**Figura 12E**).

Todos los ratones trasplantados con progenitores transducidos con ICN1 desarrollaron eficientemente una leucemia con características de T-ALL y fueron sacrificados usando el criterio de punto final, para proceder a la caracterización fenotípica de los linfoblastos presentes en los distintos órganos. El análisis por citometría de flujo reveló que las células leucémicas detectadas en un mismo ratón tenían un fenotipo idéntico, independientemente de su localización, y eran en su totalidad células T (Thy1.2⁺) positivas en diferente proporción para CD4, CD8, TCRβ y CD3 (**Figura 13A**), que sobre-expresaban ICN1 (**Figura 13B**); aunque, de acuerdo con los datos descritos en otros modelos, observamos cierta heterogeneidad en cuanto a la expresión de los marcadores CD4 y CD8. Considerando este criterio, pudimos identificar dos tipos de leucemias. En un grupo de ratones, las células ICN1⁺ eran principalmente células CD4⁺ CD8⁺ DP e incluían una población minoritaria de células maduras CD8⁺ SP, presentando ambas subpoblaciones una expresión homogénea de CD3 y del TCRαβ (Fenotipo 1). El segundo grupo de animales presentaba una población ICN1⁺ constituida por dos subpoblaciones bien diferenciadas: DP, similares a las anteriores, y CD8^{int} SP con baja expresión de CD8 (Fenotipo 2), con distintos niveles de expresión de CD3 y del TCRαβ, que eran en general menores en la segunda (**Figura 13A** y Datos no mostrados). A pesar de estas diferencias fenotípicas en las células leucémicas de los ratones trasplantados, no detectamos diferencias significativas entre ambos tipos de ratones en cuanto a la latencia de la enfermedad, o a la expansión de las células leucémicas ICN1⁺ en los distintos órganos (**Figura 13C y D** y Datos no mostrados). Asimismo, el trasplante seriado de cada tipo de leucemia dio lugar al desarrollo de la enfermedad con una eficiencia y latencia semejante en los nuevos huéspedes (**Figura 13E**), indicando que la

RESULTADOS

frecuencia de células con actividad iniciadora de leucemia (LIC) era similar en sendas leucemias. Por tanto, los dos tipos de T-ALL fueron considerados equivalentes en los estudios posteriores.

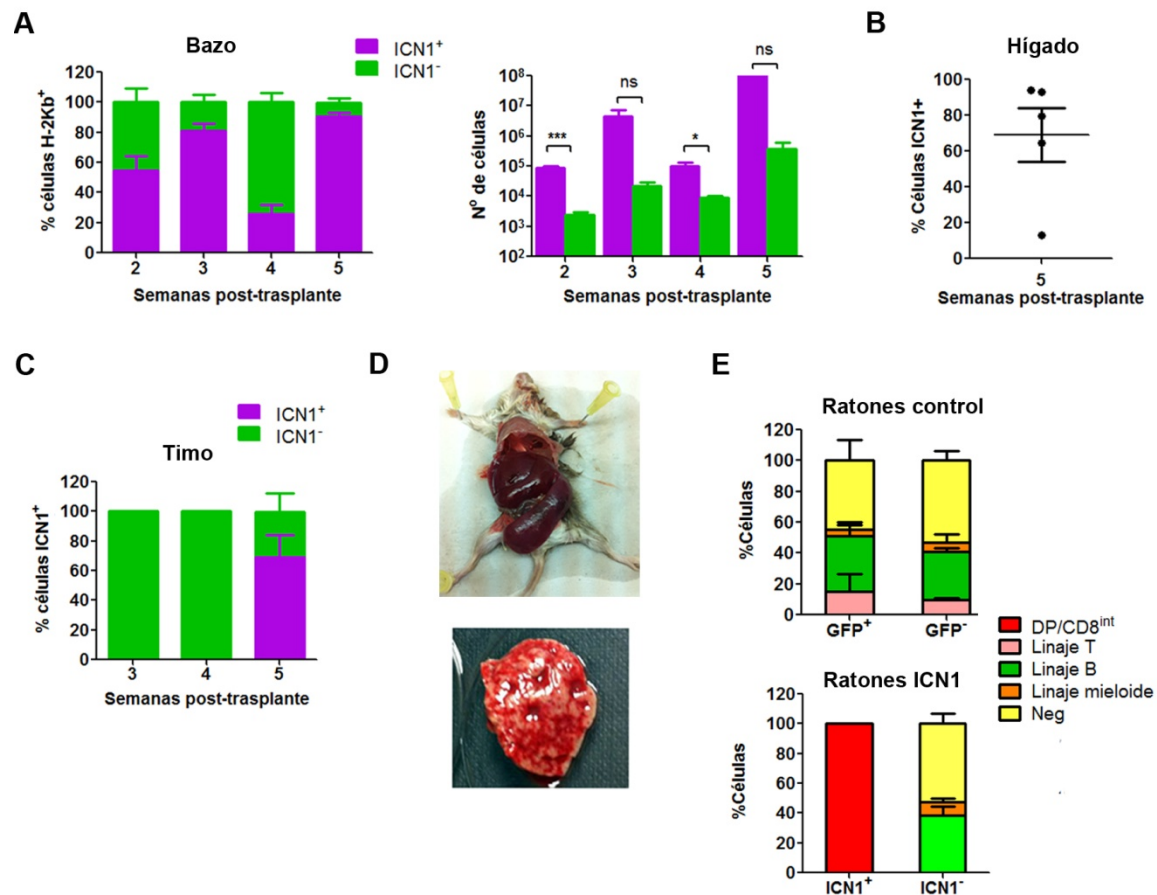


Figura 12. Infiltración del bazo, hígado y timo por células ICN1⁺ en ratones trasplantados con progenitores Lin⁻c-kit⁺ que sobre-expresan ICN1. (A) Porcentajes de las poblaciones ICN1⁺ e ICN1⁻, relativizados al 100% de células H-2Kb⁺ presentes en el bazo, a distintos tiempos post-trasplante (izquierda) y números totales de las mismas poblaciones, normalizados para 3×10^3 células iniciales (derecha). Se muestra la significación estadística de los datos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). (B) Porcentajes de la población ICN1⁺ presente en el hígado de 5 animales a semana 5 post-trasplante. (C) Porcentajes de las poblaciones ICN1⁺ e ICN1⁻ detectadas en el timo de los animales trasplantados a los tiempos indicados. En A y C las barras representan la media \pm SEM de al menos tres ratones. (D) Ejemplo representativo del aspecto del bazo e hígado de un ratón tras cinco semanas de trasplante con progenitores ICN1⁺. (E) Linajes mayoritarios de las poblaciones H-2Kb⁺ GFP⁺ y GFP⁻ (Ratones control) y H-2Kb⁺ ICN1⁺ e ICN1⁻ (Ratones ICN1) detectadas a semana 5 post-trasplante en los bazos de ratones inyectados con progenitores GFP⁺ o ICN1⁺, respectivamente. Neg significa negativo para los marcadores estudiados (CD4, CD8, B220, CD11b).

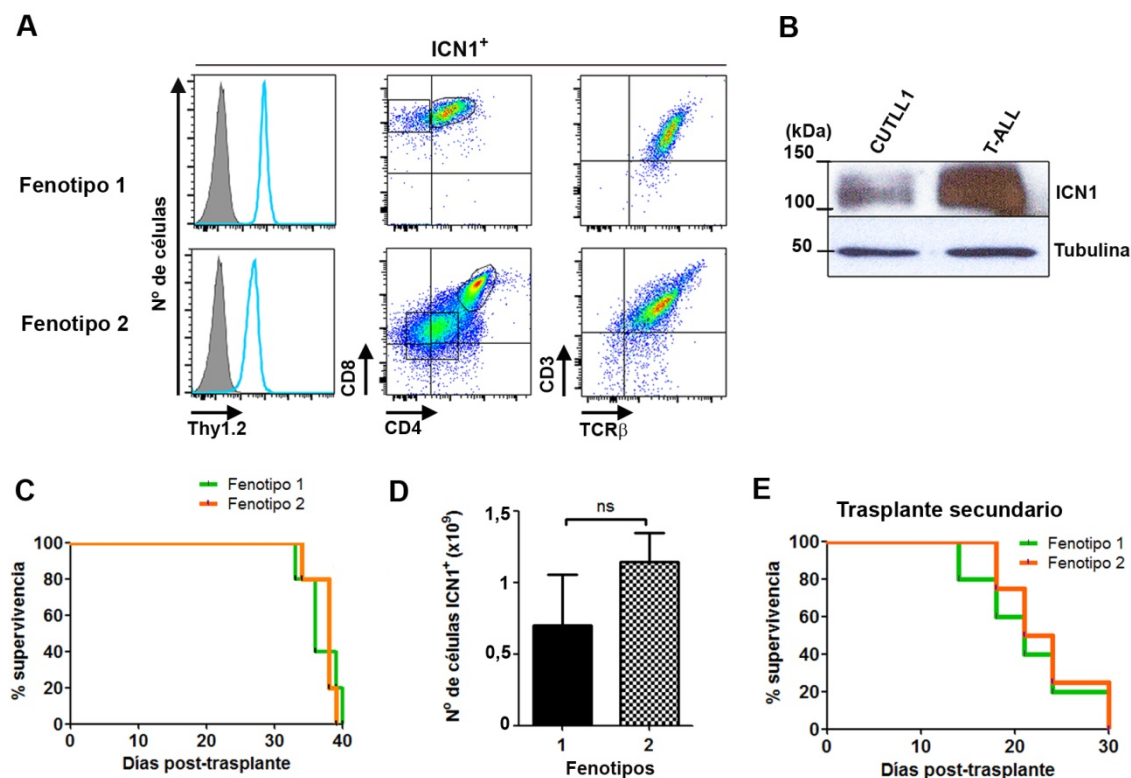


Figura 13. Caracterización fenotípica y funcional de las células leucémicas generadas en ratones trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ que sobre-expresan ICN1. (A) Identificación de dos fenotipos distintos de células T (Thy1.2⁺), definidos por la expresión de los marcadores CD4, CD8, TCRβ y CD3, en las células leucémicas ICN1⁺. Las tinciones se realizaron sobre células ICN1⁺ obtenidas de los bazo en el momento del sacrificio a 5 semanas pos-trasplante y los histogramas mostrados constituyen un ejemplo representativo de cada grupo de ratones (n=6). (B) Detección del estado de activación de la vía de Notch1 (expresión de ICN1) mediante *Western Blot* en las T-ALL generadas. Se utilizó la línea celular CUTLL1 como control positivo de la expresión de ICN1. Se muestra el peso molecular en kilodaltons (kDa). (C) Curva Kaplan-Meier de supervivencia de los ratones con Fenotipo 1 vs. Fenotipo 2. (D) Números totales de células ICN1⁺ presentes en el bazo de los ratones con Fenotipo 1 y Fenotipo 2 en el momento del sacrificio. Las barras representan la media ± SEM de al menos 4 ratones. Los datos están normalizados para 2,1x10⁴ células iniciales. (E) Curva Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de los ratones en un trasplante secundario de leucemias con Fenotipo 1 vs. Fenotipo 2.

Se considera que la T-ALL es una enfermedad clonal, de manera que los linfoblastos que constituyen la leucemia representan la progenie de una única célula. De hecho, trabajos previos han mostrado que las leucemias resultantes como consecuencia de la sobre-expresión de ICN1 en progenitores de MO de ratón son monoclonales para la cadena β y oligoclonales para la cadena α del TCR, lo que demuestra que el evento oncogénico es inducido por ICN1 durante o inmediatamente después del proceso de selección β, probablemente tras la adquisición de mutaciones adicionales en este estadio (Pui et al., 1999; Li et al., 2008). Para estudiar la clonalidad de las células leucémicas generadas *in vivo* en nuestro modelo, usamos distintos anticuerpos monoclonales frente a tres subtipos de cadenas TCRβ (Vβ3, Vβ5 y Vβ8), caracterizadas

RESULTADOS

por poseer diferentes regiones variables, y dos subtipos de cadenas TCR α (V α 2 y V α 11.1), y analizamos cuatro leucemias primarias independientes que mostraban una expresión homogénea de CD3 (**Figura 14**). En una de ellas (T-ALL 2), observamos una expresión relativamente homogénea de una de las cadenas TCR β analizadas (V β 8), compatible con una expansión monoclonal. Las otras tres T-ALL no mostraron un patrón monoclonal para ninguna de tres cadenas TCR β analizadas, aunque la expresión de V α 11.1 se detectó en una fracción importante de población T-ALL en las leucemias T-ALL 1 y T-ALL 4. Por tanto, aunque no podemos confirmar el origen monoclonal de estas leucemias, los patrones de expresión mostrados son compatibles con esta posibilidad.

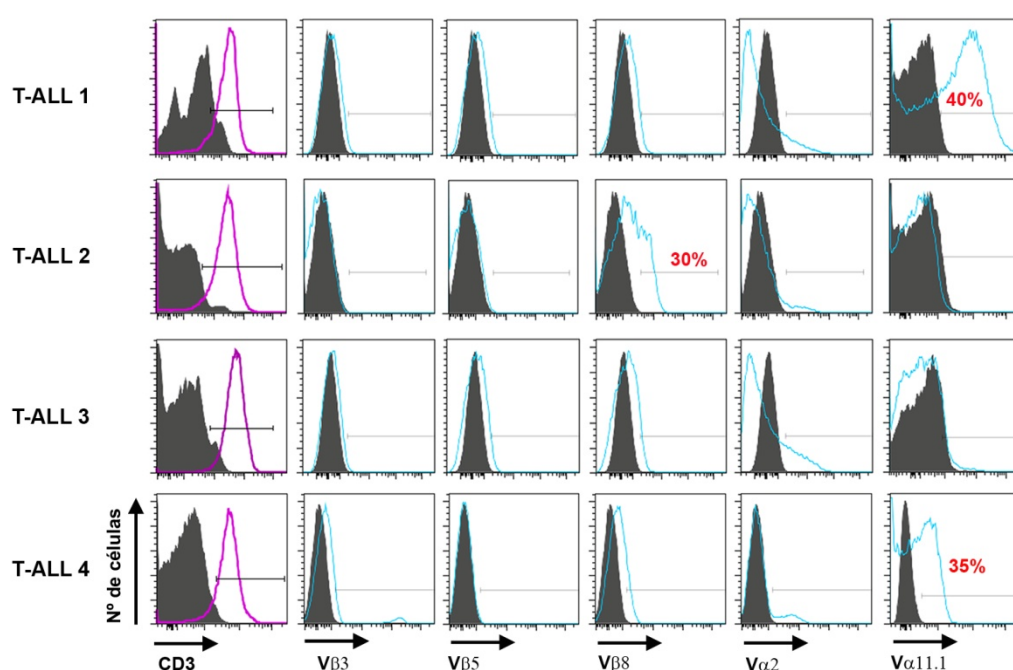


Figura 14. Estudio de la clonalidad de las T-ALLs generadas *in vivo*. Análisis por citometría de flujo de la expresión clonal del TCR $\alpha\beta$ en cuatro leucemias primarias T-ALL independientes, utilizando distintos anticuerpos anti-V β (V β 3, V β 5 y V β 8) y anti-V α (V α 2 y V α 11.1). Los histogramas de la izquierda muestran la expresión de CD3 en cada leucemia. Los números indican el porcentaje de células positivas. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotópico irrelevante.

2.2. Expresión de receptores funcionales de IL-7 en leucemias T-ALL inducidas *in vivo* por Notch1.

Los datos previos de nuestro laboratorio sobre la función de Notch1 en la regulación transcripcional de la expresión de IL-7R α en líneas celulares de T-ALL humanas, nos animaron a estudiar la posible contribución de Notch1 a la expresión del IL-7R en leucemias T-ALL primarias generadas *in vivo*. Con este objetivo, analizamos la

expresión de IL-7R α en los linfoblastos presentes en los distintos órganos de ratones trasplantados con progenitores de MO transducidos con ICN1. Observamos que las células leucémicas ICN1⁺ generadas expresaban niveles elevados de IL-7R α , independientemente de su fenotipo y su localización (**Figura 15A y B**). Las células DP leucémicas, a diferencia de las DP fisiológicas presentes en el timo (**Figura 15A**), también expresaban altos niveles del IL-7R, lo que indica que la expresión constitutiva de ICN1 induce la expresión aberrante del IL-7R en las células leucémicas. En consecuencia, la expresión del IL-7R correlacionaba directamente con los niveles de expresión de ICN1 en las células leucémicas (**Figura 15C**). A continuación, nos propusimos determinar si los receptores expresados en la membrana de las células leucémicas eran funcionales, para lo que evaluamos la activación de las vías de señalización inducidas por el IL-7R en estas células. En condiciones fisiológicas, la activación del IL-7R es dependiente de la unión a su ligando, la IL-7, lo que induce la activación de tres rutas principales de señalización: JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK. Mediante experimentos de *Western Blot*, confirmamos que las leucemias primarias activaban la vía de JAK/STAT en respuesta a IL-7. Las vías de MAPK/ERK y PI3K/AKT estaban activas de forma basal, aunque se observó una activación adicional de PI3K/AKT en respuesta a IL-7 (**Figura 15D**). Con el objetivo de estudiar la posible contribución del eje IL-7/IL-7R a la proliferación de las T-ALL *in vitro*, realizamos cultivos de dos leucemias primarias independientes sobre la línea de células estromales de MO OP9 en presencia o ausencia de IL-7 exógena, y observamos que la proliferación de las células leucémicas era significativamente mayor cuando suplementábamos el cultivo con IL-7 (**Figura 15E**). Estos datos, en conjunto, indican que Notch1 induce la expresión de receptores funcionales para IL-7 en las T-ALL, y sugieren que el IL-7R puede contribuir a la proliferación de las células leucémicas T-ALL dependientes de ICN1.

2.3. La expresión del IL-7R es necesaria para la progresión *in vivo* de las T-ALL inducidas por la activación aberrante de Notch1.

La expresión de IL-7R funcionales capaces de inducir la proliferación de las T-ALL *in vitro* sugiere la posibilidad de que el IL-7R pueda contribuir a la proliferación de las células leucémicas también *in vivo*, por lo que nuestro siguiente objetivo fue analizar si la expresión de IL-7R α es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad y/o para la proliferación de las leucemias generadas por ICN1 en un modelo de trasplante en ratón. Para ello, decidimos proceder al silenciamiento del gen *Il7ra*, utilizando vectores lentivirales empleados previamente en el laboratorio que contienen horquillas de ARN (shRNA) capaces de inhibir específicamente la expresión del gen *IL7R* humano (shIL7R). La homología de las secuencias diana en ratón y humanos es prácticamente completa, a excepción de 3 nucleótidos. Como control, se utilizó el mismo vector lentiviral portador

RESULTADOS

de un shRNA irrelevante (shsc), y ambos vectores también codifican para GFP, que se usó como trazador celular.

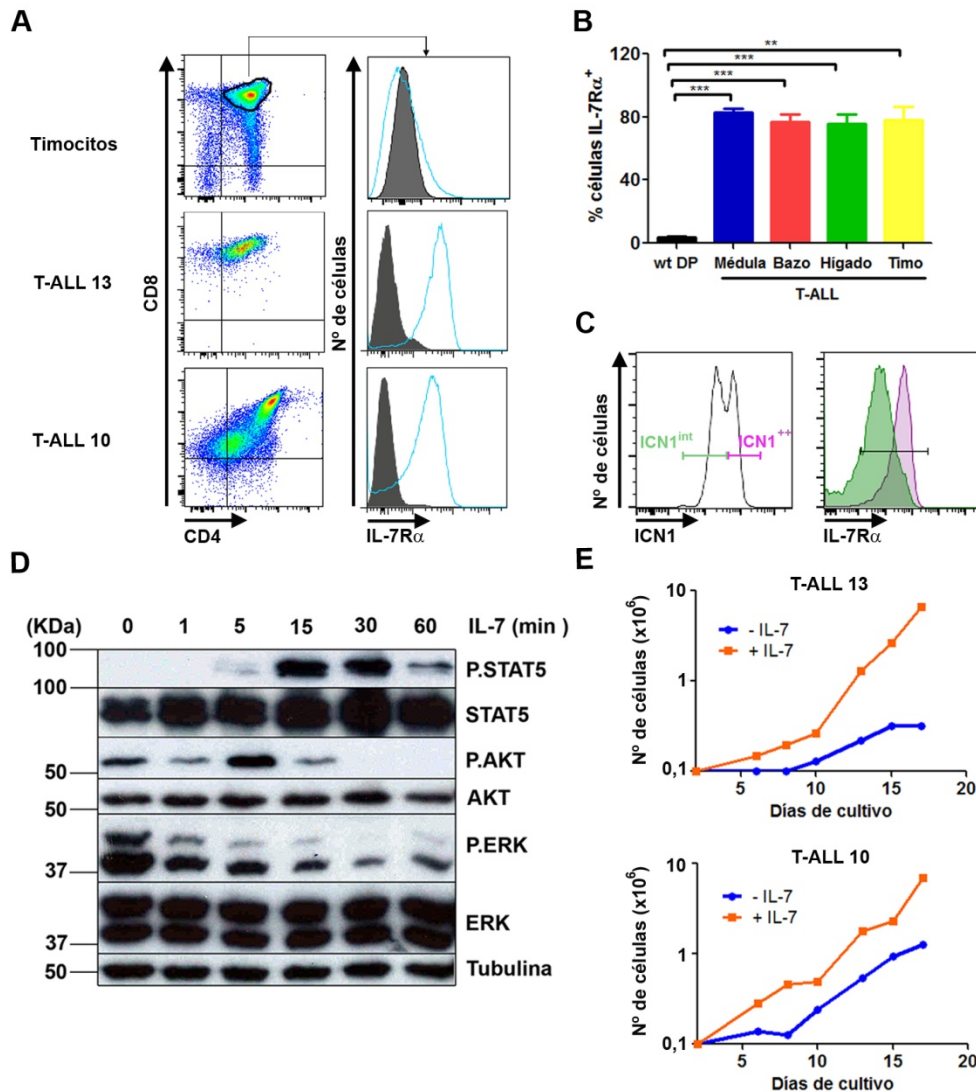


Figura 15. ICN1 induce la generación de T-ALLs que expresan IL-7R funcionales. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de IL-7R α (derecha) en células DP CD4⁺ CD8⁺ de timo de ratones C57BL/6 normales (superior) y en dos leucemias primarias ICN1⁺ independientes (inferior), generadas en ratones trasplantados con progenitores de MO transducidos con ICN1. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. (B) Cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de células que expresan IL-7R α en la población DP de timo de ratones control (wt DP) o en las células DP ICN1⁺ leucémicas generadas en MO, Bazo, Hígado y Timo. Las barras representan la media \pm SEM de al menos ocho leucemias primarias independientes. Se indica la significación estadística de cada grupo con respecto a la condición wt DP (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (C) Expresión por citometría de flujo de IL-7R α en dos subpoblaciones de una leucemia primaria (T-ALL 4) (derecha), definidas por los niveles de expresión de ICN1 (ICN1^{int} e ICN1⁺⁺) (izquierda). (D) Análisis mediante *Western Blot* de la activación de las vías JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK tras la estimulación de células leucémicas primarias con 200 IU/ml de rhIL-7 a los tiempos indicados. Se indica el peso molecular correspondiente en kilodaltons (kDa). (E) Proliferación *in vitro* de dos leucemias primarias independientes cultivadas sobre estroma OP9 en presencia o no de 200 IU/ml de rhIL-7 a los tiempos indicados.

La eficiencia del silenciamiento del *Il7ra* se analizó tras la transducción con estos vectores de células de la línea EL4 de linfoma T de ratón, que expresan niveles altos de IL-7R α . El análisis de la expresión de IL-7R α por citometría de flujo mostró una disminución clara de la expresión de la proteína en la superficie de las células EL4 transducidas con el shIL7R cuatro días después de la infección (**Figura 16A**), tanto en términos de la proporción de células que expresaban el IL-7R, como de los niveles de expresión en la población IL-7R $^{+}$ remanente (**Figura 16B**), lo que correlacionaba con la disminución en la expresión del ARNm del *Il7ra* (**Figura 16C**). En resumen, la estrategia de silenciamiento del gen *Il7ra* resultó en la inhibición significativa de la expresión en la membrana de la cadena IL-7R α y, por tanto, del IL-7R, en las células EL4 de ratón.

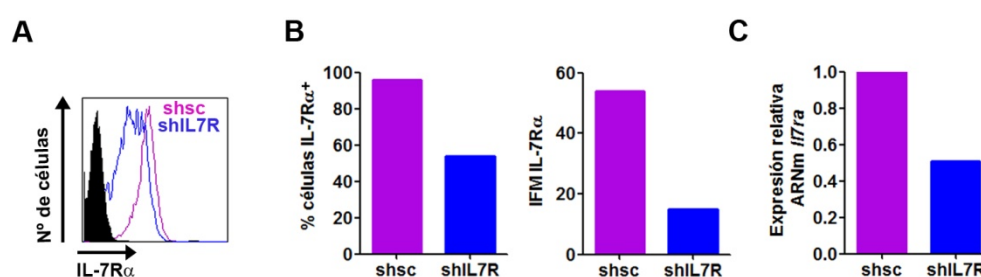


Figura 16. Silenciamiento de la expresión de IL-7R α en células EL4. (A) Expresión en membrana de IL-7R α en células EL4 transducidas con un vector lentiviral portador de un shRNA frente al *IL7R* (shIL7R) o de un shRNA control (shsc) mantenidas *in vitro* durante cuatro días. (B) Porcentaje de células positivas para la expresión de IL-7R α en membrana (izquierda) e intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de IL-7R α (derecha), analizados por citometría de flujo en células EL4 transducidas con el vector shIL7R o el vector control. (C) Expresión relativa de ARNm del *Il7ra* analizada mediante PCR cuantitativa en las células EL4 transducidas en (B). Los valores se normalizaron a la expresión endógena de *Gapdh*.

Una vez comprobada la eficiencia de los shRNAs frente al gen *Il7ra*, quisimos determinar el efecto del silenciamiento de IL-7R α sobre la supervivencia y proliferación *in vivo* de las T-ALL primarias de ratón dependientes de Notch1. Para ello, aprovechamos nuestra disponibilidad de una de las leucemias IL-7R $^{+}$ generadas por sobre-expresión de ICN1 (**Figura 17A y B**) que tras su progresión *in vivo*, había perdido la expresión de GFP probablemente por metilación del promotor SFFV del vector lentiviral (T-ALL 20). El silenciamiento de GFP nos permitió realizar transducciones con los vectores lentivirales portadores de shIL7R o de shsc, que expresaban también GFP como trazador, y determinar la eficiencia de la transducción a las 72h post-infección.

RESULTADOS

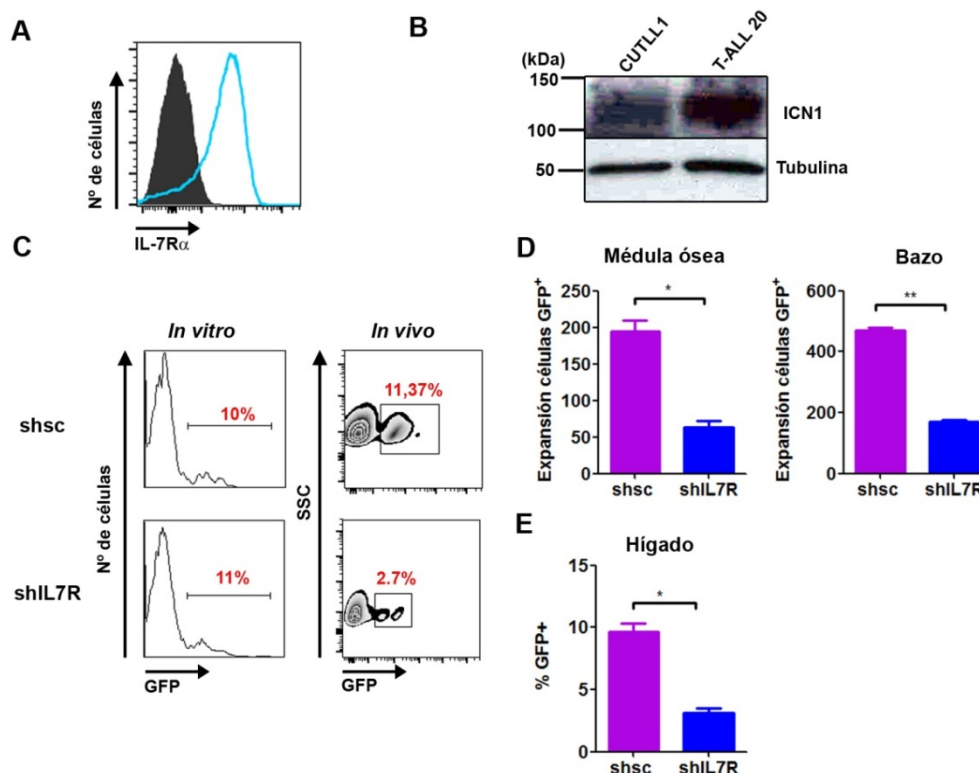


Figura 17. La expresión del IL-7R es necesaria para la expansión *in vivo* de las T-ALLs dependientes de ICN1. (A) Expresión en membrana de IL-7R α en la leucemia primaria T-ALL 20 de ratón inducida por ICN1, determinada por citometría de flujo previamente al silenciamiento del IL-7R. (B) Detección del estado de activación basal de la vía de Notch1 por expresión de ICN1 mediante *Western Blot* en la T-ALL 20. Se utilizó la línea celular CUTLL1 como control positivo de la expresión de ICN1. Se muestra el peso molecular en kilodaltons (kDa). (C) Eficiencia de transducción (% de células GFP⁺) en la leucemia infectada con los vectores shsc o shIL7R, analizada por citometría de flujo (izquierda). Cuantificación de las poblaciones de células T-ALL 20 transducidas (GFP⁺) con el vector control o shIL7R recuperadas del bazo de los ratones trasplantados, a 2 semanas post-trasplante (derecha). Los números indican el porcentaje de células positivas para el correspondiente vector. (D) Cuantificación de la expansión de las células transducidas con el vector shsc o shIL7R en MO y bazo. Los datos se normalizaron para un número inicial de células transducidas de 10⁴. (E) Porcentaje de células transducidas con shsc o shIL7R (% GFP⁺) en el hígado de los ratones trasplantados. Las barras representan la media \pm SEM de al menos tres ratones analizados a 2 semanas post-trasplante. Se muestra la significación estadística de los datos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Ambos vectores mostraron eficiencias de transducción similares (aproximadamente 10%) (**Figura 17C**). Para analizar el efecto del silenciamiento de IL-7R α *in vivo*, las células leucémicas transducidas con shIL7R o con shsc se trasplantaron en ratones inmunodeficientes *Rag2*^{-/-}*γc*^{-/-}, que fueron sacrificados cuando presentaron síntomas claros de enfermedad para analizar la progresión de la leucemia. En ambos casos observamos la infiltración de la MO, el bazo, y el hígado con células leucémicas (**Figura 17D y E**), pero detectamos grandes diferencias. La proporción de células transducidas (GFP⁺) con el shsc control se mantuvo constante en los animales trasplantados respecto a la población GFP⁺ inicial (11%) (**Figura 17C, E** y Datos no

mostrados), indicando que las células transducidas y no transducidas habían sufrido una expansión similar *in vivo*, que fue de unas 200 veces en la MO y 500 veces en el bazo tras el trasplante (**Figura 17D**). Por el contrario, la proporción de células leucémicas en las que se había silenciado el IL-7R α disminuyó significativamente tras el trasplante ($2,9 \pm 0,2\%$ en la MO; $3,3 \pm 0,3\%$ en el bazo; $3,1 \pm 0,3\%$ en el hígado) (**Figura 17C, E** y Datos no mostrados), indicando una desventaja de proliferación *in vivo* frente a las células no transducidas. En consecuencia, la expansión celular de las células silenciadas fue significativamente menor que la de las células transducidas con el shsc en distintas localizaciones (60 veces menor en la MO y 170 en el bazo) (**Figura 17D**). Por tanto, el silenciamiento del IL-7R en las células leucémicas ICN1⁺ reduce el potencial de proliferación de las mismas y su progresión tumoral *in vivo*. Es importante destacar que la fracción residual de células GFP⁺ detectadas *in vivo* tras el silenciamiento debe proceder de la expansión de una pequeña población con una menor eficiencia de silenciamiento, a juzgar por los bajos niveles de expresión GFP y por la expresión de niveles considerables de IL-7R α que, aunque menores que los de las células no transducidas, deben ser funcionales *in vivo* (Datos no mostrados). En conclusión, nuestros datos indican que Notch1 controla la proliferación *in vivo* de la T-ALL, al menos en parte, a través del IL-7R.

2.4. La expresión del IL-7R confiere una ventaja selectiva *in vivo* a las células T-ALL con actividad iniciadora de leucemia.

El modelo de células madre tumorales propone la existencia de células iniciadoras de la leucemia o LICs, capaces de iniciar y mantener la progresión de la leucemia *in vivo*. Las LICs coexisten en el huésped con su progenie, que constituye el resto del tumor y contiene células con un mayor grado de diferenciación que, a diferencia de las LICs, son incapaces de propagar la enfermedad en un segundo huésped en experimentos de transferencia *in vivo* (revisado en Wang y Dick, 2005). Diversos estudios han sugerido la implicación de la vía de Notch1 (Armstrong et al., 2009; Tatarek et al., 2011; Ma et al., 2012) y de algunas de sus dianas, como c-myc e IGF-1R, en la funcionalidad de las LICs, incluyendo su supervivencia y auto-renovación, por lo que nos planteamos la hipótesis de que los efectos de Notch1 sobre las LICs podrían estar mediados a través del IL-7R.

RESULTADOS

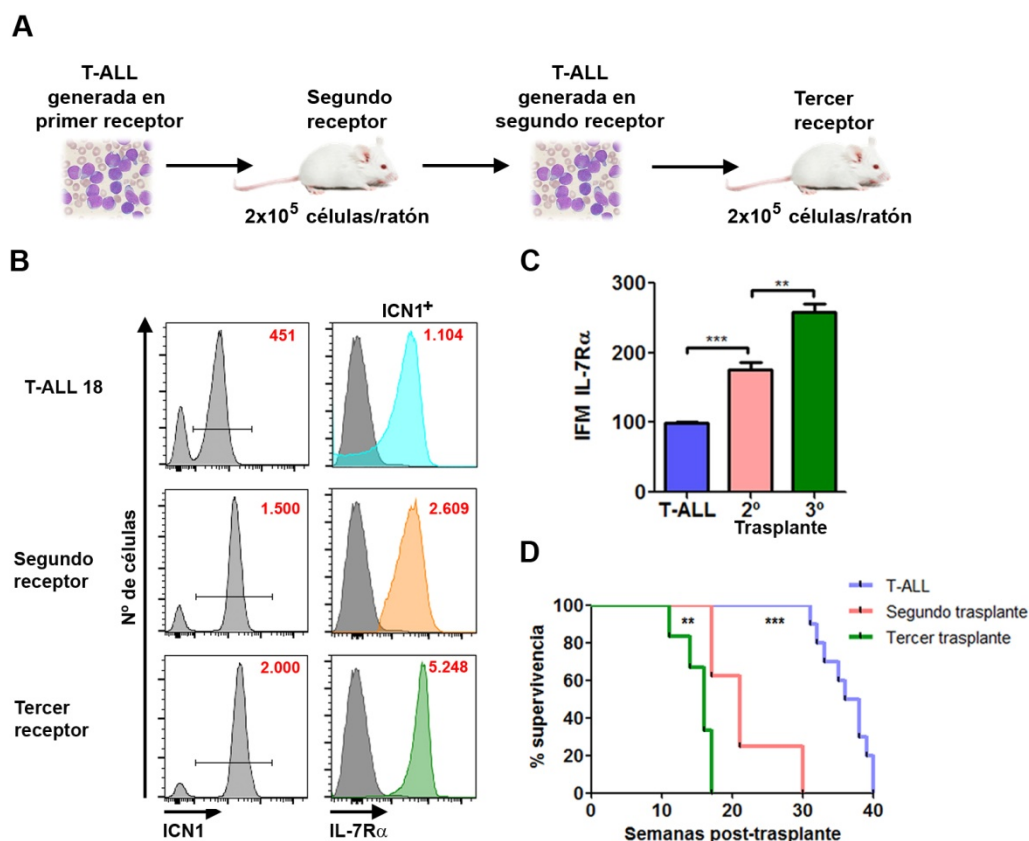


Figura 18. La expresión del IL-7R confiere una ventaja selectiva *in vivo* a las células leucémicas T-ALL con actividad LIC. (A) Esquema del modelo de trasplante seriado de leucemias en ratones inmunodeficientes. (B) Expresión de IL-7Rα determinada por citometría de flujo en las células ICN1⁺ (izquierda) de una leucemia inducida *in vivo* en ratones trasplantados con progenitores de MO transducidos con ICN1 (T-ALL 18) y en las células obtenidas tras el trasplante seriado de las primeras en un segundo y tercer receptor. Los números indican la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de expresión del IL-7R analizada con un anticuerpo anti-IL-7Rα. (C) Cuantificación de la IFM ± SEM de la expresión de IL-7Rα en las leucemias recuperadas tras los trasplantes seriados en receptores secundarios y terciarios con respecto a la leucemias de origen. Los valores de IFM están relativizados al 100% de expresión en la T-ALL de origen. (D) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones en los que se originó la T-ALL y de los sucesivos receptores. Los datos representan la media de al menos 6 ratones. En C y D se indica la significación estadística de los resultados (** p< 0,01; *** p< 0,001).

Para investigar esta posibilidad, decidimos analizar la expresión del IL-7R en las células con actividad LIC de leucemias primarias T-ALL de ratón inducidas por ICN1. Utilizamos para ello el modelo convencional de identificación de LICs basado en el trasplante seriado de leucemias primarias en sucesivos huéspedes. Este modelo experimental induce la selección y expansión *in vivo* de los clones leucémicos más agresivos, con una mayor actividad LIC (Dick, 2008; Anderson et al., 2011; Clappier et al., 2011). Como se muestra en un experimento representativo en la **Figura 18**, las células de la leucemia T-ALL 18 obtenidas de ratones trasplantados con progenitores

transducidos con ICN1 mostraron niveles elevados del IL-7R. Cuando estas células (2×10^5) se trasplantaron en un nuevo receptor (segundo receptor), observamos un incremento significativo en los niveles de expresión del IL-7R en las células procedentes del segundo huésped, y este incremento también se observó en la población leucémica obtenida de un tercer receptor trasplantado con las células leucémicas del segundo, correlacionando con un incremento en los niveles de expresión de ICN1 (**Figura 18B y C**). Por tanto, los niveles de expresión del IL-7R en las células leucémicas se incrementaban progresivamente con los trasplantes, lo que sugería una ventaja selectiva *in vivo* de las células con mayores niveles de expresión del IL-7R. Más importante, cuando analizamos la supervivencia de los animales en una curva de Kaplan-Meier, observamos una disminución significativa del tiempo de latencia de la enfermedad y de la supervivencia de los animales tras los sucesivos trasplantes (**Figura 18D**), lo que indica un enriquecimiento progresivo en células con actividad LIC, que se correlacionaba de forma directa con los niveles de expresión del IL-7R en las células trasplantadas. Colectivamente, estos resultados indican que los clones de células T-ALL con mayor expresión del IL-7R poseen una ventaja que permite su selección y propagación *in vivo*, lo que sugiere que el IL-7R podría ser un marcador de LICs en la T-ALL.

2.5. La expresión ectópica de IL-7R α no altera la generación de la T-ALL inducida por ICN1.

Los datos anteriores indican que la expresión del IL-7R confiere una ventaja proliferativa a las células leucémicas con actividad LIC durante la progresión de la enfermedad *in vivo*. Es, por tanto, posible que el IL-7R pudiera estar implicado funcionalmente en la patogénesis de la leucemia inducida por mutaciones activadoras de Notch1. Para analizar esta posibilidad, nuestro siguiente objetivo fue determinar si la señalización a través del IL-7R coopera con ICN1 durante la inducción del proceso oncogénico. Con este fin, utilizamos una estrategia de ganancia de función consistente en la transducción con ICN1 de progenitores de MO procedentes de ratones transgénicos para *Il7ra*, en los que la expresión del transgen se induce bajo el promotor de CD2 humano en células del linaje T a partir de los estadios DN1-DN2 (Yu et al., 2004). El objetivo concreto fue analizar la eficiencia de generación de leucemia en ratones NSG trasplantados con las células transgénicas transducidas con ICN1 en comparación con animales trasplantados con el mismo número células ICN1⁺ procedentes de ratones *wild-type*. Cuando comparamos la cinética de aparición de células ICN1⁺ en la MO de los animales de ambos grupos, observamos un mayor porcentaje y número (1×10^6 vs. $0,17 \times 10^5$) de células ICN1⁺ transgénicas con respecto a las *wild-type* a semana 2 post-trasplante (**Figura 19A y B**), lo que podría predecir la generación de una T-ALL más agresiva derivada de las primeras. No obstante, estas diferencias desaparecieron a partir

RESULTADOS

de la semana 3 post-trasplante (**Figura 19A y B**), a partir de la cual se incrementaron los números de células ICN1⁺ en los animales control. Por tanto, la expresión transgénica de IL-7R α no resultó en la generación de una leucemia más agresiva, con mayor capacidad proliferativa *in vivo* o menor tiempo de latencia. Además, las T-ALLs generadas en la MO en ambos grupos de ratones mostraron características fenotípicas similares a los distintos tiempos analizados (**Figura 19C y Datos no mostrados**).

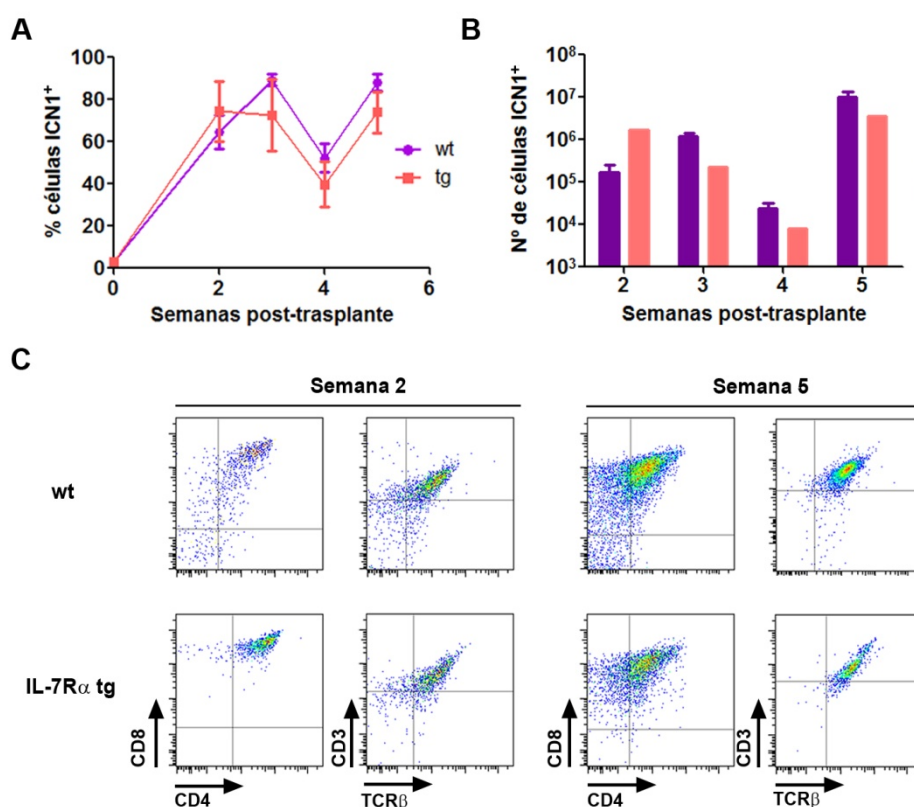


Figura 19. La expresión de un transgen *Il7ra* no altera la eficiencia de generación y expansión *in vivo* de células T ectópicas inducidas por ICN1 en la MO. (A) Porcentaje y (B) números totales de células transducidas con ICN1 derivadas de progenitores Lin⁻ c-kit⁺ de MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* o transgénicos para IL-7R α , generadas en la MO de ratones H-2Kb⁺ a los tiempos post-trasplante indicados. Los valores en (A) se relativizaron al total de células H-2Kb⁺ recuperadas y en (B) están normalizados para 3x10³ células ICN1⁺ trasplantadas por ratón. En A y B los datos en cada punto representan la media \pm SEM de al menos tres ratones. (C) Expresión de los marcadores CD8, CD4, CD3 y TCR β en las células ICN1⁺ *wild-type* y transgénicas detectadas en la MO de los animales trasplantados en (A), a 2 y 5 semanas post-trasplante. Los histogramas son representativos de los datos obtenidos en al menos tres ratones por grupo.

Asimismo, no observamos diferencias significativas en la capacidad de infiltración de los principales órganos linfoides (bazo y timo) y no linfoides (hígado) por las células ICN1⁺ transgénicas con respecto a las ICN1⁺ *wild-type* ni en su capacidad de expansión, a juzgar por los números relativos y absolutos de células leucémicas infiltrantes y por las

cinéticas de colonización de dichos órganos (**Figura 20A** y Datos no mostrados). Más aún, el tiempo medio de supervivencia de los ratones en ambas condiciones fue idéntico (**Figura 20B**). Estos datos sugieren que, aunque la expresión del transgen *Il7ra* se induce eficientemente en las células ICN1⁺ dando lugar a niveles de expresión de IL-7Rα significativamente mayores que los niveles endógenos en las células *wild-type* (**Figura 20C**), dicha expresión no altera sustancialmente el proceso de generación de la T-ALL inducida por ICN1.

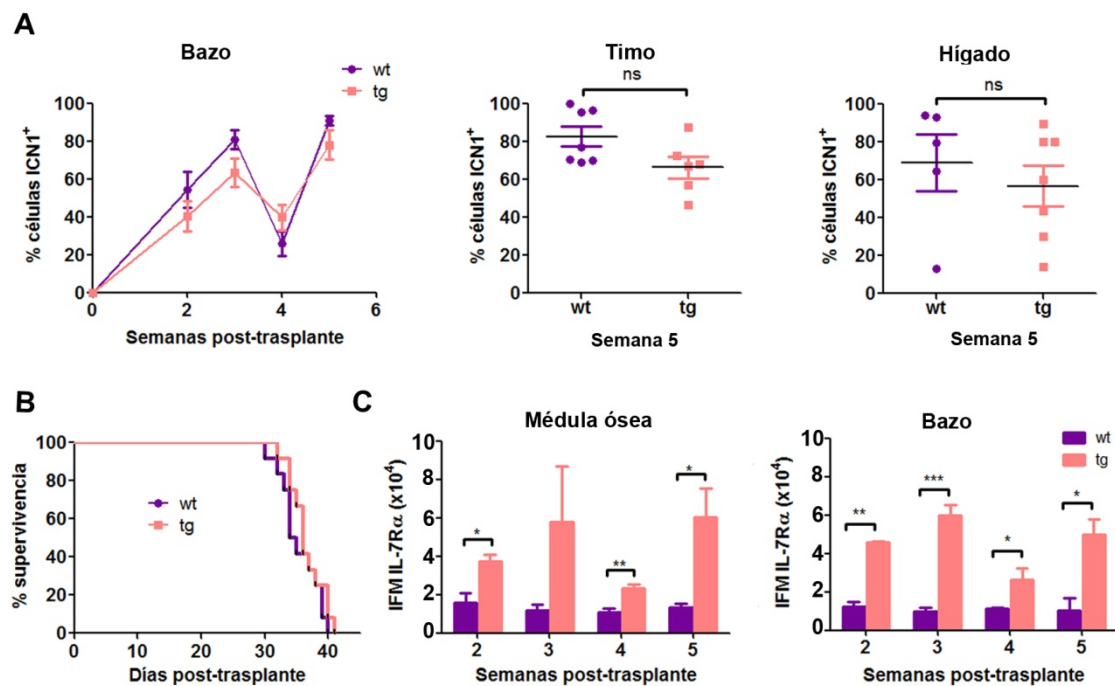


Figura 20. La expresión ectópica de un IL-7R transgénico no altera la eficiencia de generación de T-ALL inducida por ICN1 ni el tiempo de latencia de la enfermedad. (A) Porcentaje de células ICN1⁺ derivadas de progenitores Lin⁻ c-kit⁺ de MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* o transgénicos para IL-7Rα detectadas en el bazo, timo e hígado de ratones H-2Kb⁺ a los tiempos post-trasplante indicados. Los valores se relativizaron al total de células H-2Kb⁺ recuperadas. (B) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones trasplantados con progenitores de MO *wild-type* o IL-7Rα transgénicos transducidos con ICN1. (C) Expresión de IL-7Rα medida como intensidad de fluorescencia media (IFM) y determinada por citometría de flujo de las células ICN1⁺ *wild-type* vs. IL-7Rα transgénicas de la MO (izquierda) y bazo (derecha) de los ratones en (A) a los tiempos post-trasplante indicados. Se muestra la significación estadística de los resultados obtenidos (* p<0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001). Los datos en A, B y C representan la media ± SEM de al menos tres ratones.

2.6. La función del IL-7R es crucial en la patogénesis de la T-ALL inducida por Notch1.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican que la expresión transgénica de IL-7R α no aporta una ventaja selectiva a las células leucémicas inducidas por ICN1, lo que podría sugerir que la expresión del IL-7R no coopera con ICN1 en la patogénesis de la T-ALL. Sin embargo, hay que resaltar que, conforme a la demostración en este estudio de que el *Il7ra* es una diana transcripcional de Notch1, las células *wild-type* transducidas con ICN1 ya expresaban niveles elevados de IL-7R α , que podrían ser funcionalmente óptimos para generar la leucemia. En esta situación, el sistema de sobre-expresión de IL-7R α no nos permitiría establecer la contribución real del IL-7R al proceso oncogénico. Para estudiar esta posibilidad, optamos por utilizar un modelo de pérdida de función consistente en el empleo de progenitores de MO de ratones deficientes en el gen *Il7ra* o *Il7ra* KO, para comparar su potencial de generación de leucemia con el de progenitores *wild-type* (Figura 21A) tras la expresión de ICN1 y el trasplante en ratones inmunodeficientes *Rag2*^{-/-}*γc*^{-/-} (Figura 21B y C).

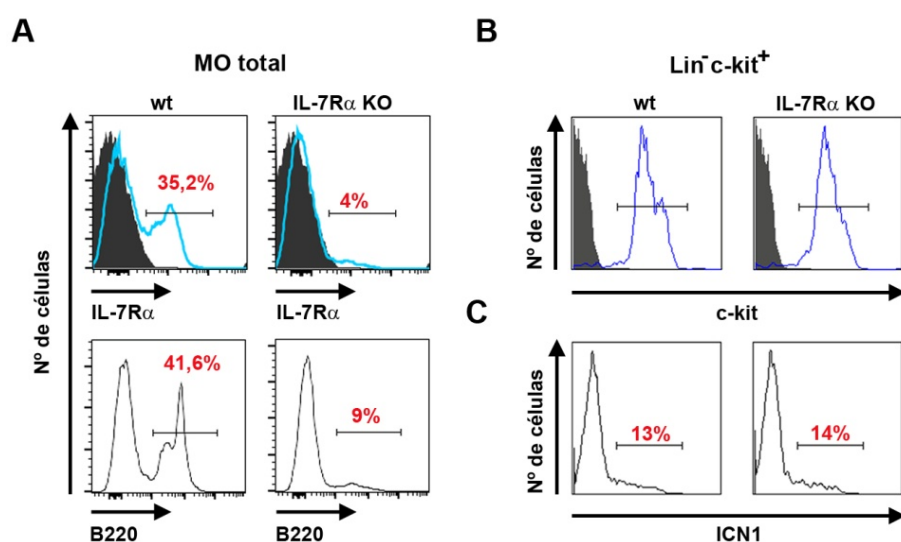


Figura 21. Fenotipo de las células de la MO de ratones *wild-type* y IL-7R α KO y eficiencia de transducción con ICN1 de los correspondientes progenitores Lin⁻ c-kit⁺ tras su selección. (A) Expresión de IL-7R α y de B220 en las células residentes en la MO de ratones *wild-type* (wt) o IL-7R α KO analizada por citometría de flujo. (B) Expresión de c-kit en los progenitores Lin⁻ c-kit⁺ tras su selección de la MO de ratones *wild-type* o IL-7R α KO. (C) Eficiencia de transducción de los progenitores Lin⁻ c-kit⁺ *wild-type* o IL-7R α KO infectados con un vector lentiviral portador de ICN1 y GFP como trazador. Los números en A y C indican el porcentaje de células positivas. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Para monitorizar la aparición de signos de enfermedad, ambos grupos de ratones se sometieron a inspección física diaria y, complementariamente, cuatro semanas después del trasplante se extrajo sangre periférica para determinar y cuantificar la presencia de células ICN1⁺ con fenotipo aberrante. El análisis mediante citometría de flujo de la población hematopoyética reveló diferencias significativas entre ambos grupos de ratones. Si bien todos los ratones trasplantados con células *wild-type* presentaban una población ICN1⁺ que representaba el 1-46% del total de las células H-2Kb⁺ procedentes del donante, la población ICN1⁺ estaba completamente ausente en los ratones inyectados con células IL-7Rα KO (**Figura 22A y B**), en los que, no obstante, se observaron proporciones equivalentes de células totales derivadas del donante (**Figura 22C**). Estas células no transducidas (ICN1⁻) derivadas de los progenitores IL-7Rα KO eran mayoritariamente células mieloides CD11b⁺, mientras que las células linfoides estaban completamente ausentes en estos animales (**Figura 22A**). Por el contrario, las células ICN1⁻ *wild-type* eran células T maduras CD4⁺ o CD8⁺ convencionales; mientras que las ICN1⁺ mostraron un fenotipo DP, característico de las células leucémicas generadas en la sangre periférica en modelos de T-ALL inducida por ICN1 (**Figura 22A**).

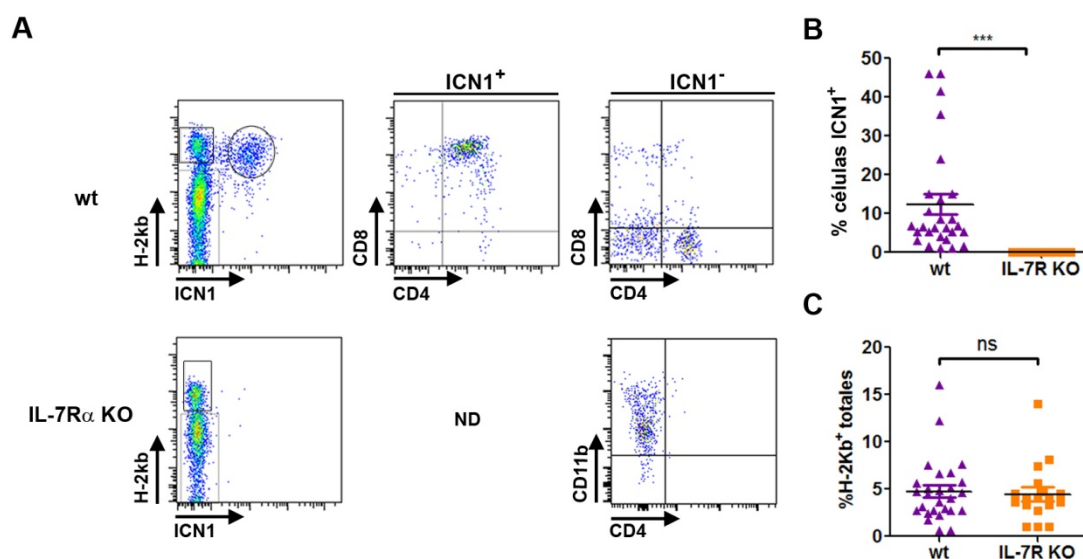


Figura 22. La deficiencia del *Il7ra* impide la generación aberrante de células CD4⁺CD8⁺ DP dependiente de ICN1. (A) Identificación y caracterización fenotípica de las células H-2Kb⁺ transducidas con ICN1 (H-2Kb⁺ ICN1⁺) o no transducidas (H-2Kb⁺ ICN1⁻) expandidas en la sangre periférica de ratones H-2Kb⁻ trasplantados con progenitores Lin⁻c-kit⁺ de MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* (wt) o IL-7Rα KO. N.D. no determinado debido a la ausencia de células. (B) Porcentajes de células ICN1⁺ dentro de la población total de células H-2Kb⁺ y (C) porcentajes de células totales H-2Kb⁺ presentes en la sangre de los ratones trasplantados como se describe en (A) a 4 semanas post-trasplante. En B y C se representan los datos de tres experimentos independientes. Se indica la significación estadística de los datos (***) $p < 0,001$.

Confirmando la generación de leucemia, los ratones del grupo *wild-type* empezaron a mostrar síntomas evidentes de enfermedad a partir de la semana 4 post-trasplante, por lo que fueron sacrificados usando el criterio de punto final, lo que permitió confirmar la presencia en estos animales de signos característicos de T-ALL como esplenomegalia, hepatomegalia e infiltración hepática. Por el contrario, estos signos se encontraban ausentes en los ratones del grupo IL-7R α KO, que permanecieron sanos durante más de 20 semanas (**Figura 23A y D**). El análisis por citometría de flujo de las células de los distintos órganos confirmó la ausencia de enfermedad en los ratones trasplantados con progenitores IL-7R α KO, en los que la población ICN1⁺ era indetectable (**Figura 23B**), mientras que en los del grupo *wild-type* encontramos que el 5-100% del total de las células de la MO, bazo, timo e hígado eran células ICN1⁺ leucémicas. En conclusión, estos datos indican que la ausencia del IL-7R impide la generación de la leucemia. No obstante, la MO y el bazo de estos ratones se reconstituyeron con células H-2Kb⁺ de linaje mieloide en números similares a los encontrados en ratones trasplantados con progenitores *wild-type* transducidos con el vector control (**Figura 23C** y Datos no mostrados), sin que se apreciara la generación de células linfoides ni la aparición de leucemia durante el periodo de monitorización de los ratones trasplantados hasta 22 semanas post-trasplante (**Figura 23D**). Asimismo, las extracciones periódicas de sangre periférica no revelaron la presencia de células ICN1⁺ (verde), pero sí células H-2Kb⁺ ICN1⁻ (azul) derivadas de los progenitores IL-7R α KO inyectados (**Figura 23E**). Por tanto, podemos concluir que la ausencia de IL-7R α impide la expansión de las células que sobre-expresan ICN1, lo que indica que la expresión del IL-7R es estrictamente necesaria para la generación de la T-ALL inducida por mutaciones activadoras en Notch1.

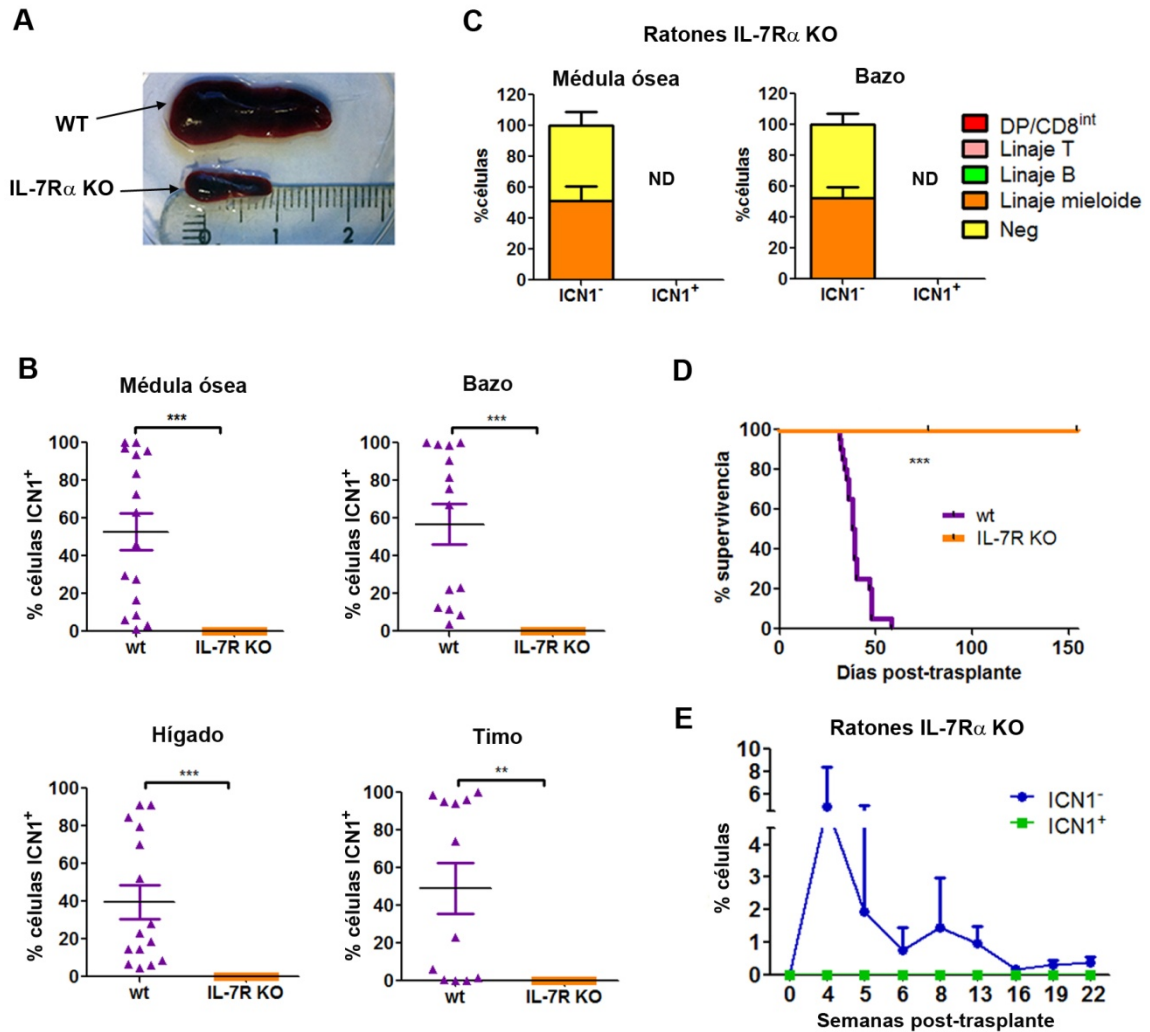


Figura 23. La función del IL-7R es esencial para la generación de T-ALL inducida por ICN1. (A) Ejemplo representativo del tamaño de los bazo de ratones trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ procedentes de la MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* (wt) o IL-7R α KO, transducidos con ICN1, a 5 semanas post-trasplante. (B) Porcentaje de células ICN1⁺ en MO, bazo, timo e hígado de los ratones trasplantados como se indica en (A). Los datos están referidos al total de células presentes en cada órgano (H-2Kb⁺ + H-2Kb⁻), a semana 5 post-trasplante. (C) Proporción de células de los linajes celulares indicados generadas a semana 5 post-trasplante en la MO y el bazo de ratones H-2Kb⁻ trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ transducidos con ICN1 procedentes de la MO de ratones H-2Kb⁺ IL-7R α KO. Neg significa negativo para los marcadores estudiados (CD4, CD8, B220, CD11b). N.D. no determinado debido a la ausencia de células. (D) Gráfica Kaplan-Meier que representa la supervivencia de los dos grupos de ratones, *wild-type* y IL-7R α KO, trasplantados como se indica en (A). (E) Porcentaje de células del donante no transducidas (H-2Kb⁺ ICN1⁻) o transducidas con ICN1 (H-2Kb⁺ ICN1⁺), presentes en la sangre periférica de los ratones trasplantados con progenitores IL-7R α KO a los tiempos indicados. Los números están relativizados al total de células de la sangre (H-2Kb⁺ + H-2Kb⁻). Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes. En B y D se indica la significación estadística de los datos (** p < 0,01; *** p < 0,001).

3. La señalización a través del pre-TCR es crucial en la patogénesis de la T-ALL dependiente de Notch1.

Notch1 juega un papel crítico no sólo durante los estadios más tempranos de la diferenciación T, sino también en el proceso de selección β , durante el cual coopera con el pre-TCR para mantener la supervivencia y la proliferación de las células pre-T (Ciofani y Zuñiga-Pflücker, 2005; Maillard et al., 2006). Además de esta cooperación de Notch1 y el pre-TCR en un contexto fisiológico, estudios llevados a cabo por varios laboratorios han sugerido la cooperación de ambas vías de señalización en la patogénesis de la T-ALL (Allman et al., 2001; Campese et al., 2006). Sin embargo, permanece abierta la controversia en cuanto al papel concreto del pre-TCR durante este proceso, y no se ha esclarecido si se trata de un requerimiento absoluto del pre-TCR por parte de Notch1 (Allman et al., 2001), o de una función cooperativa de ambos receptores que resultaría en una menor eficiencia oncogénica de ICN1 en ausencia del pre-TCR (Asnafi et al., 2003; Campese et al., 2006). Además, faltan estudios dirigidos a analizar cuál es la función concreta de la señalización a través del pre-TCR en la patogénesis de la T-ALL inducida por ICN1, ya que los trabajos realizados con anterioridad evaluaron la capacidad oncogénica de ICN1 en ratones deficientes en *Rag2*, que son incapaces de llevar a cabo los reordenamientos V(D)J en el *locus Tcrb*, por lo que sus células pre-T no llegan a expresar en la membrana el complejo pre-TCR. En estos animales, la deficiente expresión del pre-TCR ha impedido analizar de forma directa la contribución de la señalización mediada por este receptor en la generación de la T-ALL inducida por ICN1, por lo que en el presente estudio hemos utilizado un modelo animal alternativo que nos ha permitido abordar esta cuestión.

3.1. La sobreexpresión de ICN1 no revierte el bloqueo en la diferenciación intratímica de los progenitores C80G con un pre-TCR no funcional.

Con el fin de estudiar de forma directa la contribución de la señalización a través del pre-TCR al proceso leucemogénico iniciado por ICN1, establecimos una colaboración con el grupo del Dr. Balbino Alarcón, que había desarrollado un modelo de ratón (C80G) en el que una cisteína del dominio extracelular de la cadena CD3 ϵ se había sustituido por una glicina. En estos animales, los complejos pre-TCR de los timocitos pre-T son portadores de cadenas CD3 ϵ mutadas incapaces de adoptar un estado conformacional activo, lo que impide la transmisión de la señalización al interior celular (Blanco et al., 2014). Como consecuencia, estos ratones sufren un bloqueo de la diferenciación intratímica de los linfocitos T $\alpha\beta$ en el estadio DN3, previo a la selección β , que resulta en una reducción considerable del número de timocitos y en la ausencia prácticamente

total de células maduras $CD4^+$ y $CD8^+$ $TCR\alpha\beta$ en los órganos linfoides periféricos. Por tanto, los ratones C80G constituyen el modelo ideal para evaluar la contribución individual de ICN1 al proceso de selección β y su potencial oncogénico en ausencia de señalización funcional mediada a través del pre-TCR. Con este objetivo, analizamos el desarrollo intratímico y la generación de leucemia en ratones inmunodeficientes NSG trasplantados con progenitores $Lin^- c-kit^+$ aislados de la MO de ratones C80G o *wild-type* transducidos con ICN1 (**Figura 24A y B**).

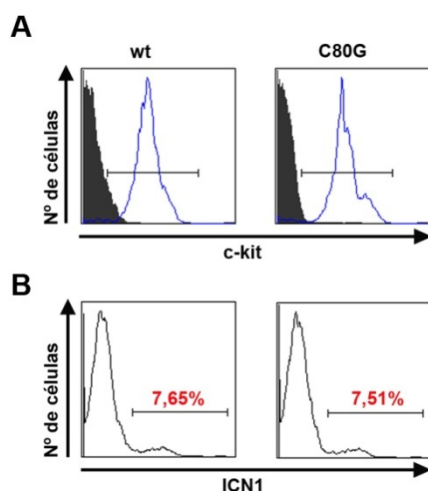


Figura 24. Sobre-expresión de ICN1 en progenitores de MO de ratones *wild-type* y C80G. (A) Expresión de c-kit en los progenitores $Lin^- c-kit^+$ aislados de la MO de ratones *wild-type* o C80G tras su selección por *sorting*. (B) Eficiencia de transducción (% de células $ICN1^+$) de los progenitores $Lin^- c-kit^+$ *wild-type* o C80G infectados con el vector lentiviral que codifica para ICN1. Los números indican el porcentaje de células positivas. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

En primer lugar, analizamos la composición de los timos de los animales trasplantados, con el fin de valorar el potencial de diferenciación de los progenitores C80G tras la sobreexpresión de ICN1. Observamos una reducción significativa, tanto en el porcentaje como en los números absolutos, de células $ICN1^+$ en los timos de estos animales, en comparación con los timos de ratones trasplantados con células *wild-type* (**Figura 25A y B**). De hecho, las células $ICN1^+$ C80G mutantes eran prácticamente indetectables en el timo en 7 de los 9 ratones analizados; mientras que 2 de ellos presentaban un porcentaje considerable de timocitos $ICN1^+$, aunque en números absolutos significativamente menores que en los animales control (**Figura 25A y B**). Aunque estos datos indican que la ausencia de un pre-TCR funcional reduce de forma drástica la proliferación celular inducida por ICN1, la expansión en estos timos de las células mutantes no transducidas era aún menor (**Figura 25C**), lo que sugiere que ICN1 induce cierta ventaja proliferativa a los progenitores intratímicos C80G, incluso en ausencia de un pre-TCR funcional. Para investigar cuál es la población intratímica susceptible de proliferar en respuesta a ICN1 en estos 2 animales, analizamos la expresión de diversos marcadores del linaje T en los timocitos $ICN1^+$ C80G y observamos la expresión de un fenotipo similar al de las células $ICN1^+$ *wild-type* en cuanto a la expresión de los marcadores CD4 y CD8, pero la ausencia total del complejo CD3- $TCR\alpha\beta$ que, sin embargo, se expresaba de forma homogénea en las células *wild-type* (**Figura**

RESULTADOS

25D). Es importante destacar que, a pesar de la falta de expresión de receptores TCR $\alpha\beta$ en la membrana, las células mutantes C80G ICN1⁺ expresaban la cadena TCR β intracelular, lo que refleja la inducción de reordenamientos V(D)J productivos en el locus *Tcrb* (**Figura 25D**) y el bloqueo de la diferenciación intratímica en el estadio pre-TCR⁺. Por tanto, la expresión ectópica de Notch1 activo es insuficiente para revertir el bloqueo de la diferenciación intratímica de los progenitores C80G que expresan receptores pre-TCR no funcionales, y para inducir la expansión celular asociada al proceso de selección β , aunque es suficiente para promover la expresión de los marcadores CD4 y CD8 y la adquisición del fenotipo DP.

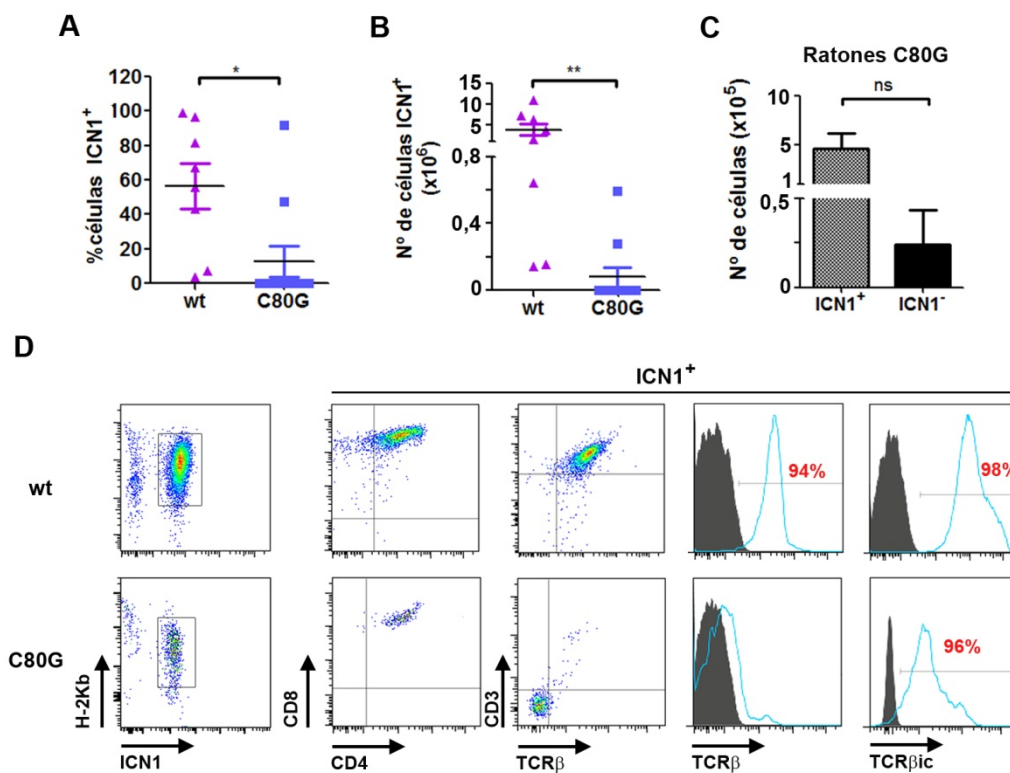


Figura 25. La expresión ectópica de ICN1 no revierte el bloqueo en la selección β de los timocitos C80G con un pre-TCR no funcional. (A) Porcentaje de células ICN1⁺ presentes en el timo de los ratones H-2Kb⁻ trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ aislados de la MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* o C80G, transducidos con ICN1. (B) Números totales de células ICN1⁺ *wild-type* y C80G detectadas en el timo de los animales trasplantados en (A). Los números se normalizaron para 2,1x10⁴ células ICN1⁺ iniciales. En A y B se indica la significación estadística de los resultados (*p< 0,05; ** p< 0,01). (C) Números absolutos de células C80G transducidas (ICN1⁺) y no transducidas (ICN1⁻) detectados en el timo de los animales en (A), a 5 semanas post-trasplante, normalizados para 2,1x10⁴ células iniciales. (D) Caracterización fenotípica de las poblaciones ICN1⁺ *wild-type* y C80G identificadas en el timo de los animales trasplantados en (A), y analizadas tras su selección electrónica por citometría de flujo como se muestra en los histogramas de la izquierda. En los histogramas monoparamétricos se muestra la expresión de TCR β en membrana (TCR β) e intracelular (TCR β ic). Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico control. Se representan datos procedentes dos experimentos independientes

3.2. La generación de T-ALL por sobreexpresión de ICN1 es dependiente de la señalización a través del pre-TCR.

Nuestro siguiente objetivo fue analizar el potencial de ICN1 para generar células T C80G ectópicas. Un análisis temprano a dos semanas post-trasplante de la MO de los ratones, puso de manifiesto la presencia de una población ICN1⁺ en ambos tipos de animales, aunque en una proporción significativamente menor en el grupo C80G (**Figura 26A**). Asimismo, los números absolutos de células ICN1⁺ C80G en la MO eran inferiores que los de la población ICN1⁺ *wild-type* (**Figura 26B**), indicando una menor tasa de proliferación.

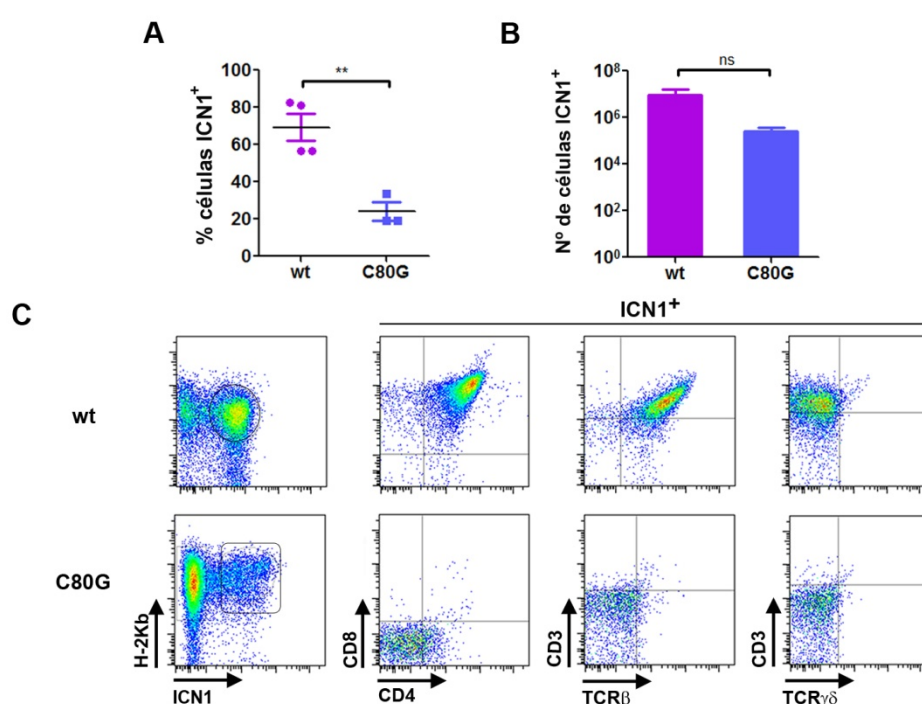


Figura 26. La generación de células ectópicas DP en la MO por sobre-expresión de ICN1 es dependiente de la función del pre-TCR. (A) Porcentajes de células ICN1⁺ generadas en la MO de ratones H-2Kb⁻ trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ aislados de la MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* o C80G, transducidos con ICN1. Los valores se relativizaron al total de células H-2Kb⁺ recuperadas. (B) Números totales de células ICN1⁺ *wild-type* o C80G recuperadas de la MO de los animales trasplantados en (A). Los números están normalizados a 2,1x10⁴ células ICN1⁺ iniciales. Las barras corresponden a la media ± SEM de al menos 3 ratones. En A y B se indica la significación estadística de los datos (** p < 0,01). (C) Fenotipo determinado por citometría de flujo de las células ICN1⁺ *wild-type* y C80G identificadas en la MO de los animales trasplantados en (A). Se analizó la expresión de CD8, CD4, CD3, TCRβ y TCRγδ en las células H-2Kb⁺ ICN1⁺ derivadas del donante, seleccionadas electrónicamente (histogramas de la izquierda). Los histogramas mostrados son un ejemplo representativo de dos experimentos independientes (N=3-4).

En cuanto al fenotipo de las células generadas, observamos que, como era esperable, la expresión constitutiva de ICN1 en células *wild-type* tenía como consecuencia la generación de una población ectópica aberrante de fenotipo DP, y el bloqueo de la diferenciación de linajes no T en la MO; mientras que las células ICN1⁺ C80G eran negativas para la expresión en la membrana de las proteínas CD4, CD8, TCR β y CD3 del linaje T $\alpha\beta$. Además, analizamos la expresión del receptor TCR $\gamma\delta$, ya que se ha descrito la generación de un subtipo de células $\gamma\delta$, V γ 1.1⁺, en ratones C80G (Blanco et al., 2014), y observamos que las células también eran negativas para el receptor TCR $\gamma\delta$ (**Figura 26C**), lo que indica que las células ICN1⁺ localizadas en la MO de estos ratones no eran células T. Por tanto, la generación ectópica de células T DP en la MO por sobreexpresión de ICN1 es dependiente de la función del pre-TCR.

Con el objetivo de monitorizar la evolución de la población ICN1⁺ de células mutantes C80G identificada en la MO de los animales trasplantados, investigamos su posible migración a la periferia, para lo que analizamos el fenotipo de las poblaciones de la sangre tres semanas después del trasplante. En estos animales, la población ICN1⁺ mutante era prácticamente indetectable en la sangre; mientras que en los ratones trasplantados con células *wild-type*, las células ICN1⁺ constituían aproximadamente el 10% del total de células sanguíneas procedentes del donante y todas ellas presentaban un fenotipo aberrante DP (**Figura 27A y B**). Por tanto, la falta de funcionalidad del pre-TCR impide la expansión en sangre periférica de células T aberrantes inducida por ICN1. Como era esperable del bloqueo en la diferenciación intratímica en los ratones C80G (Blanco et al., 2014), tampoco se generaron linfocitos T a partir de células mutantes no transducidas (ICN1⁻) (Datos no mostrados). Por el contrario, observamos la generación de linfocitos B y, en menor proporción, células mieloides C80G (Datos no mostrados), en números similares a las correspondientes células *wild-type* (**Figura 27C**). En consecuencia, estos resultados corroboran la deficiencia selectiva en la generación de linfocitos T a partir de progenitores con un pre-TCR mutante y sugieren que ICN1 es insuficiente para generar células T aberrantes de fenotipo leucémico en ausencia de un pre-TCR funcional.

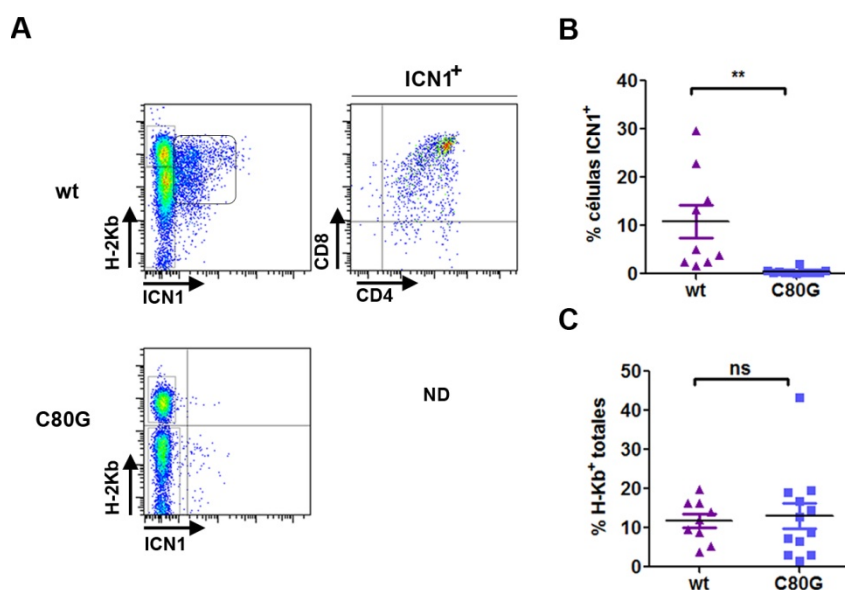


Figura 27. Ausencia de células ICN1⁺ en la sangre periférica de los ratones trasplantados con progenitores de MO C80G transducidos con ICN1. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD4 y CD8 en las células H-2Kb⁺ ICN1⁺ (izquierda) generadas a 3 semanas post-trasplante en la sangre periférica de ratones H-2Kb⁺ trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ transducidos con ICN1. N.D. no determinado debido a la ausencia de células. (B) Porcentaje de células ICN1⁺, relativizado al total de células H-2Kb⁺ generadas en la sangre periférica de los ratones trasplantados en (A). (C) Reconstitución con células H-2Kb⁺ totales de la sangre periférica de los ratones trasplantados en (A). En B y C se muestra la significación estadística de los resultados (** p< 0,01). Los datos mostrados proceden de dos experimentos independientes (N= 9-12).

El seguimiento de los animales trasplantados confirmó esta conclusión, ya que observamos la aparición de signos claros de enfermedad a partir de la semana 5 post-trasplante en los ratones reconstituidos con células *wild-type*, pero no en los trasplantados con células mutantes. El análisis por citometría de flujo de la MO de los animales confirmó la presencia de células T ICN1⁺ ectópicas en el 100% de los ratones del grupo *wild-type*, mientras que sólo se detectaron células ICN1⁺ en dos de los nueve ratones que habían sido trasplantados con células C80G (**Figura 28A**), aunque en números significativamente menores (del orden de 500 veces) (**Figura 28B**), y ninguno de estos animales presentó signos de enfermedad. Además, los números totales de células ICN1⁺ mutantes eran significativamente menores que los de sus correspondientes células C80G no transducidas (**Figura 28C**), y presentaban un fenotipo similar al de las células C80G no transducidas (**Figura 28D**), correspondiente mayoritariamente a linfocitos B y, en menor proporción, a células mieloides; pero no mostraban el fenotipo leucémico DP (CD4⁺ CD8⁺ TCRαβ⁺ CD3⁺) característico de las células ICN1⁺ *wild-type* (**Figura 28D**). En conjunto, estos datos indican que la sobreexpresión de ICN1 en progenitores de la MO de ratones C80G, cuyas células T expresan

RESULTADOS

receptores pre-TCR no funcionales, no es suficiente para inducir la generación de células DP extratímicas, ni la transformación oncogénica que determina la generación de una leucemia T-ALL.

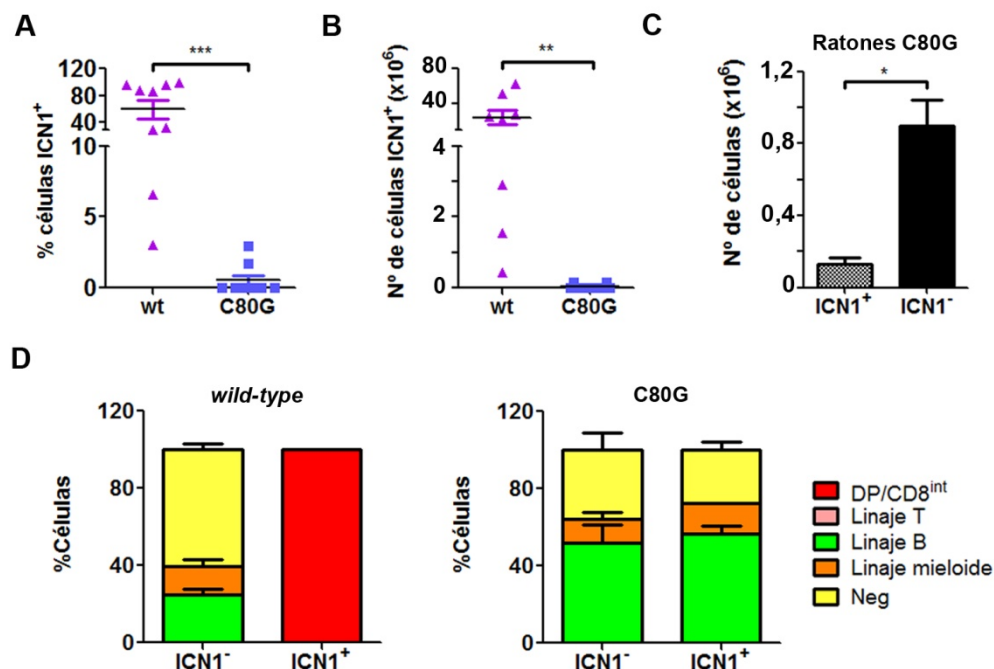


Figura 28. La señalización a través del pre-TCR es necesaria para la generación y expansión de células DP ICN1⁺ en la MO. (A) Porcentajes de células ICN1⁺ generadas en la MO de ratones H-2Kb⁺ trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ aislados de la MO de ratones H-2Kb⁺ *wild-type* o C80G, transducidos con ICN1. Los datos están referidos al total de células presentes en la MO (H-2Kb⁺ + H-2Kb⁻), a semana 5 post-trasplante. (B) Números totales de células ICN1⁺ *wild-type* o C80G recuperadas de la MO de los animales trasplantados en (A). (C) Números absolutos de células C80G transducidas con ICN1 (ICN1⁺) o no transducidas (ICN1⁻) detectados en la MO de los ratones trasplantados en (A). Los datos en B y C están normalizados para 2,1x10⁴ células iniciales. En A, B y C se indica la significación estadística de los datos (* p<0,5; ** p<0,01; *** p<0,001). Las barras representan la media ± SEM. (D) Proporción de los linajes celulares caracterizados en las poblaciones ICN1⁺ e ICN1⁻ *wild-type* o C80G recuperadas a 5 semanas post-trasplante de la MO de los animales trasplantados en (A). Neg significa negativo para los marcadores estudiados (CD4, CD8, B220, CD11b). En A, B, C y D se representan datos de dos experimentos independientes.

La incapacidad de ICN1 para inducir T-ALL a partir de las células mutantes C80G se corroboró tras el análisis de los bazo y hígados de los ratones receptores, a 5 semanas post-trasplante. La presencia de células ICN1⁺ fue completamente indetectable en el bazo de 8 de los 9 ratones trasplantados con progenitores C80G transducidos con ICN1, mientras que el ratón restante presentaba una población ICN1⁺ en el bazo, aunque en unas proporciones significativamente bajas (<0,5% del total; **Figura 29A**) y en números absolutos muy reducidos (**Figura 29B**) con respecto al grupo de ratones reconstituidos con células ICN1⁺ *wild-type*. A diferencia de éstas, las células C80G ICN1⁺

no mostraban una ventaja proliferativa *in vivo* con respecto a las células C80G no transducidas, por lo que no se observaron signos de esplenomegalia (**Figura 29C y D**), ni presentaban el fenotipo aberrante DP característico de las células T-ALL; por el contrario, estas células, al igual que las ICN1⁻ (Datos no mostrados) eran en su mayoría células B (**Figura 29E**). Conforme a la ausencia de potencial oncogénico de estas células, ninguno de los ratones presentó infiltrados de células ICN1⁺ en el hígado, que eran característicos de los ratones trasplantados con células ICN1⁺ *wild-type* (**Figura 29F**).

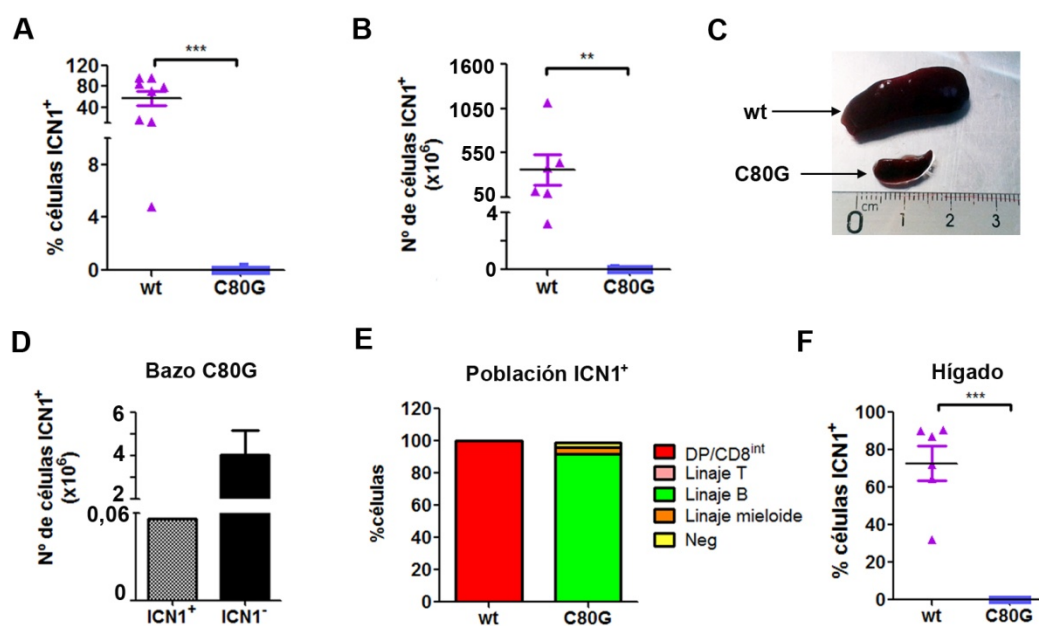


Figura 29. Las células ICN1⁺ C80G no infiltran el bazo ni el hígado de los ratones trasplantados. (A) Porcentaje de células ICN1⁺ *wild-type* y C80G, relativizado al total de células del bazo (H-2Kb⁺ + H-2Kb⁻), detectadas en el bazo de ratones H-2Kb⁻ 5 semanas después del trasplante. (B) Números absolutos de células ICN1⁺ en el bazo de los ratones inyectados con células *wild-type* y C80G, respectivamente, normalizados para 2,1x10⁴ células ICN1⁺ iniciales. En A y B se indica la significación estadística de los resultados (** p< 0,01; *** p< 0,001). (C) Ejemplo representativo del aspecto de un bazo perteneciente a un ratón trasplantado con progenitores *wild-type* vs. otro trasplantado con progenitores C80G transducidos con ICN1. (D) Números absolutos de células C80G ICN1⁺ vs. ICN1⁻ detectadas en el bazo a 5 semana post-trasplante. Los datos están normalizados para 2,1x10⁴ células iniciales. Las barras representan la media ± SEM. (E) Linajes mayoritarios de la población ICN1⁺ detectada a semana 5 en la MO de ratones trasplantados con progenitores *wild-type* y C80G. Neg significa negativo para los marcadores estudiados (CD4, CD8, B220, CD11b). (F) Porcentajes de células ICN1⁺ *wild-type* y C80G identificadas en el hígado a semana 5. Se representan datos de dos experimentos independientes.

Estos datos en conjunto indican que la ausencia de un pre-TCR funcional impide la generación de la leucemia T-ALL inducida por ICN1. Pero podría ocurrir que la ausencia de señalización por el pre-TCR resultara en un mayor tiempo de latencia de la

T-ALL reflejado en un retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad. Para analizar esta posibilidad, utilizamos dos estrategias complementarias consistentes en el seguimiento de los ratones trasplantados con células C80G durante un periodo de tiempo largo, 36 semanas, monitorizando la posible expansión de las células ICN1⁺ en los ratones mediante análisis de sangre periférica periódicos. Durante este tiempo no detectamos la presencia de una población ICN1⁺ en ninguno de los ratones analizados (**Figura 30A**). No obstante, todos los animales mostraron reconstitución a largo plazo con células no transducidas que eran mayoritariamente linfocitos B y, en menor medida, células mieloides (**Figura 30B**); observándose altos niveles de quimerismo (10-50%) (**Figura 30C**). Además, comprobamos el estado físico de los animales semanalmente con el objetivo de detectar posibles signos de enfermedad, pero estos permanecieron sanos durante las 36 semanas de observación (**Figura 30D**). Tras este periodo, los ratones fueron sacrificados y analizados, revelándose la ausencia total de células ICN1⁺ tanto en la MO, como en el bazo, hígado y timo; si bien dichos órganos estaban eficientemente reconstituidos por células ICN1⁻ procedentes de los progenitores del donante (Datos no mostrados). Por tanto, podemos concluir que ICN1 induce la eficiente transformación oncogénica de los progenitores de la MO de ratones *wild-type*, generando una T-ALL agresiva con un tiempo de supervivencia medio de 5 semanas, mientras que la ausencia de un pre-TCR funcional en dichos precursores resulta en la inhibición de la generación de leucemia durante, al menos, 36 semanas post-trasplante (**Figura 30D**). La segunda estrategia, consistente en la realización de trasplantes seriados para valorar la actividad LIC, confirmó la ausencia de capacidad leucémica de las células ICN1⁺ recuperadas a semana 5 post-trasplante de la MO y bazo de los ratones trasplantados con progenitores C80G transducidos. Estos ratones, no desarrollaron la enfermedad durante un periodo de 30 semanas, a diferencia de los que fueron inyectados con células ICN1⁺ *wild-type*, que mostraron una supervivencia media de 2-3 semanas (**Figura 30E**). En conclusión, podemos confirmar que las células C80G transducidas con ICN1 no son capaces de generar una leucemia y que, por tanto, ICN1 requiere la presencia de un pre-TCR funcional durante el proceso de generación de la T-ALL.

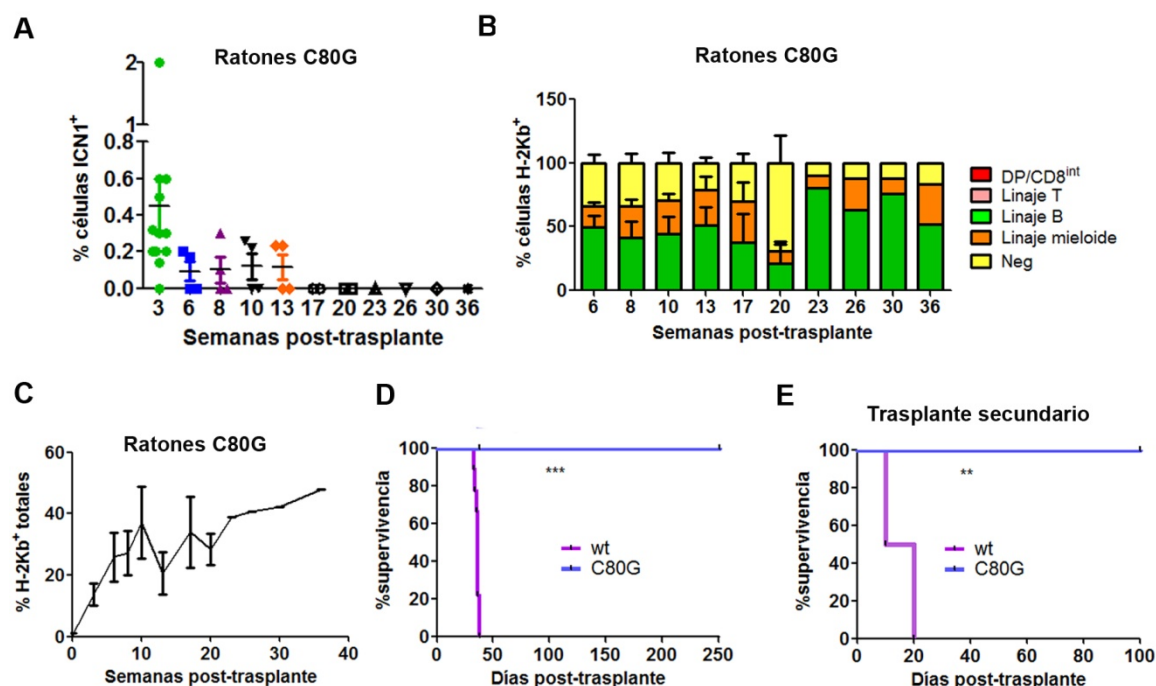


Figura 30. ICN1 requiere la presencia de un pre-TCR funcional durante el proceso de generación de la T-ALL. (A) Porcentajes de células ICN1⁺ presentes a los tiempos indicados en la sangre periférica de los ratones trasplantados con progenitores Lin⁺ c-Kit⁺ de MO de ratones C80G tras su transducción con ICN1. Los números están referidos al total de células H-2Kb⁺ del donante (ICN1⁺ + ICN1⁻) en la sangre. (B) Proporción de células de los linajes celulares indicados derivadas de progenitores C80G no transducidos y recuperadas a diferentes tiempos de la sangre periférica de los ratones trasplantados en (A). Neg significa negativo para los marcadores analizados (CD4, CD8, B220, CD11b). (C) Reconstitución de la sangre periférica con células del donante de los ratones trasplantados con progenitores C80G, relativizado al total de células de la sangre del receptor. (D) Curva de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de los ratones trasplantados con progenitores de MO *wild-type* y C80G transducidos con ICN1. (E) Supervivencia de los ratones trasplantados con las células C80G y *wild-type* procedentes de la MO de los ratones trasplantados en (D). Se muestra la significación estadística de los resultados (** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.3. La señalización mediada por Nck no es limitante en la patogénesis de la T-ALL inducida por ICN1, pero determina el tiempo de latencia de la enfermedad.

Los datos mostrados indican que la conformación activa del pre-TCR y, por ende, las vías de señalización activadas como consecuencia de dicho estado conformacional, son críticas para la generación de la T-ALL, por lo que la identificación de las moléculas involucradas en dichas rutas es clave por su potencial como dianas terapéuticas en el tratamiento de la T-ALL. En el caso de los linfocitos T, una de las moléculas cuya función es dependiente de la conformación activa del complejo TCR es la proteína adaptadora Nck. En linfocitos T, la activación antigénica del TCR induce un cambio conformacional que deja expuesto un dominio consenso poliprolina (PXXP) en la región intracitoplásmica de la cadena CD3ε del complejo (Martinez-Martin et al., 2009), que facilita el

RESULTADOS

reclutamiento específico de Nck a través de su dominio SH3.1, induciendo la fosforilación de los residuos tirosina de la cadena CD3 ζ , el reclutamiento de ZAP70 al TCR y su posterior fosforilación (Borroto et al., 2013). La relevancia del reclutamiento de Nck al TCR inducido como consecuencia del cambio conformacional se puso de manifiesto por el grupo del Dr. Alarcón que generó un ratón *knock-in* (KI-PRS), en el que la secuencia PXXP de CD3 ϵ se sustituyó por una secuencia AXXA (Borroto et al., 2013). En estos animales, el desarrollo intratímico de los linfocitos T se encuentra bloqueado mayoritariamente en el estadio DP, lo que indica la implicación de Nck en la señalización del TCR durante el proceso de selección positiva en el timo (Borroto et al., 2013). Además, se observó una inhibición parcial del proceso de selección β , que resultó en el acúmulo de timocitos en el estadio DN3 intratímico, lo que sugiere la implicación de Nck en la señalización mediada por el pre-TCR. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar si la unión de Nck al pre-TCR podría contribuir al proceso oncogénico dependiente de ICN1. Para estudiar esta posibilidad, realizamos trasplantes de progenitores Lin⁻ c-Kit⁺ aislados de la MO de ratones *wild-type* o KI-PRS y transducidos con ICN1 en ratones inmunodeficientes *Rag2*^{-/-} γ c^{-/-}, en los que estudiamos la aparición de células leucémicas en la periferia. El análisis de la sangre periférica a 4 semanas post-trasplante reveló la presencia de una población ICN1⁺ con fenotipo DP leucémico en los ratones de ambos grupos (**Figura 31A** y Datos no mostrados). Sin embargo, el porcentaje de células ICN1⁺ en los ratones del grupo KI-PRS era significativamente menor que el de los ratones de la condición *wild-type*, a pesar de que la capacidad de reconstitución de las células de ambos donantes era similar (alrededor de un 25%) (**Figura 31B**). Estos datos sugieren una menor eficiencia de generación leucémica en respuesta a ICN1 en ausencia de reclutamiento de Nck al pre-TCR, lo que podría resultar en un retraso en la aparición de la enfermedad.

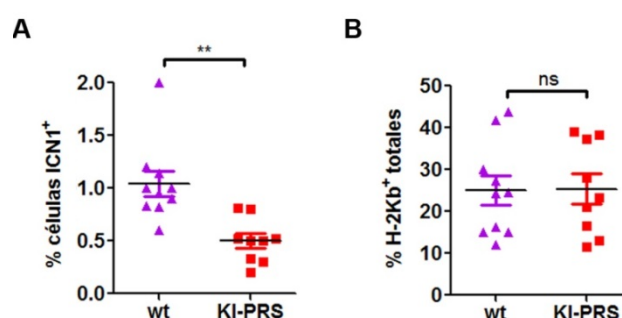


Figura 31. La ausencia de señalización mediada por Nck no impide la generación periférica de células T aberrantes DP inducida por ICN1. (A) Porcentaje de células ICN1⁺ presentes a 4 semanas post-trasplante en la sangre periférica de los ratones trasplantados con progenitores Lin⁻ c-Kit⁺ de MO de ratones *wild-type* o KI-PRS tras su transducción con ICN1. Los números están referidos al total de células H-2Kb⁺ del donante (ICN1⁺ + ICN1⁻) en la sangre. (B) Reconstitución de la sangre periférica con células del donante de los ratones trasplantados en (A). Se indica la proporción de células totales derivadas del donante *wild-type* o KI-PRS (% de células H-2Kb⁺ totales) en relación al total de células de la sangre del receptor. Se muestra la significación estadística de los datos (** p< 0,01).

La monitorización de los ratones durante las semanas posteriores no reveló una cinética retrasada, ni un defecto en la generación de leucemia en los ratones trasplantados con células mutantes, ya que el 100% de los ratones de ambos grupos sucumbió a la enfermedad presentando una supervivencia media similar (*wild-type*: 41.5 días, KI-PRS: 43 días) (**Figura 32A**). El análisis de los distintos órganos tampoco mostró diferencias significativas en la expansión de las células leucémicas en la MO de ambos tipos de ratones, ni en su capacidad de infiltración del bazo, hígado o timo, en números absolutos y relativos (**Figura 32B** y Datos no mostrados). Asimismo, los fenotipos de las células ICN1⁺ *wild-type* y KI-PRS en los distintos órganos fueron idénticos y correspondían mayoritariamente al fenotipo aberrante DP TCRαβ⁺ (**Figura 32C y 33A**). Por tanto, podemos concluir que, aunque la funcionalidad del pre-TCR dependiente de su conformación activa es esencial en la generación de la leucemia T-ALL, el reclutamiento de Nck a las cadenas CD3ε asociadas al pre-TCR no es limitante en el proceso, lo que sugiere la existencia de mecanismos de señalización compensatorios que permiten la generación de la leucemia.

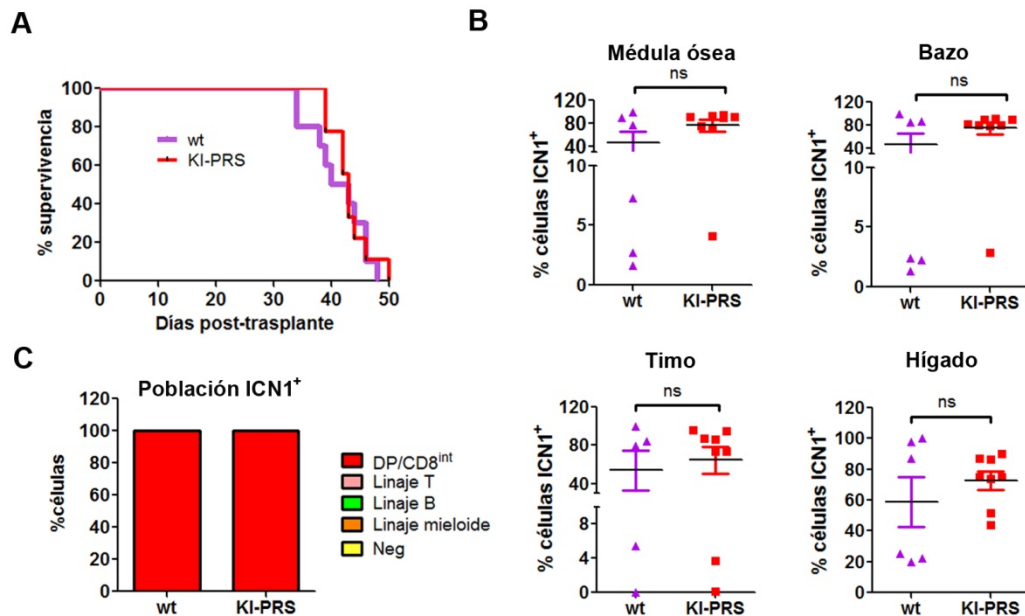


Figura 32. La señalización mediada por Nck no es limitante en la patogénesis de la T-ALL inducida por ICN1. (A) Curva de Kaplan-Meier que representa la supervivencia de los ratones trasplantados con progenitores Lin⁻ c-kit⁺ de MO de ratones *wild-type* o KI-PRS tras su transducción con ICN1. (B) Porcentaje de células ICN1⁺ *wild-type* y KI-PRS, detectadas en la MO, bazo, timo e hígado de los ratones trasplantados en (A) a semana 5 post-trasplante. Los números representan el porcentaje referido al total de células en cada órgano. Se muestra la significación estadística de los datos. (C) Fenotipo de las células ICN1⁺ *wild-type* y KI-PRS identificadas en el bazo de los ratones trasplantados en (A).

Tales mecanismos deben también permitir la generación de números reducidos de células T maduras observadas en los ratones KI-PRS. Además de su deficiente generación, estas células T mutantes muestran una deficiente función del TCR, a juzgar por la drástica reducción de su capacidad de proliferación en respuesta a la estimulación del TCR $\alpha\beta$ (Borroto et al., 2014). Es, por tanto, posible que los complejos TCR $\alpha\beta$ expresados en las células leucémicas KI-PRS mutantes muestren una deficiencia funcional similar, lo que podría tener importantes consecuencias en la progresión tumoral. Para analizar esta cuestión cuantificamos mediante citometría de flujo la proliferación de varias leucemias primarias que habíamos generado en los animales trasplantados con progenitores *wild-type* y KI-PRS transducidos con ICN1, en respuesta a la activación del TCR con distintas concentraciones de un anticuerpo anti-CD3, en ausencia de o en combinación con señales co-estimuladoras inducidas con un anticuerpo anti-CD28. Como se muestra en la **Figura 33B**, observamos una inducción de la proliferación de las leucemias *wild-type* dependiente de la concentración de anti-CD3, que se potenciaba con anti-CD28 (**Figura 33B**), lo que demuestra que la vía de señalización mediada por el complejo TCR $\alpha\beta$ -CD3 es funcional en las leucemias dependientes de ICN1. Sin embargo, el incremento en el índice de proliferación de las leucemias mutantes KI-PRS fue significativamente menor (**Figura 33B**). Entre las posibles vías de señalización dependientes de Nck que podrían estar específicamente alteradas en las células leucémicas KI-PRS, analizamos la activación de ZAP70 y mTOR, que forman parte de la vía de señalización del TCR $\alpha\beta$, mediante el análisis de la fosforilación de ZAP70 y de la proteína ribosomal S6 de las células leucémicas mutantes respecto a las *wild-type*, en respuesta a la estimulación con anti-CD3. Estos ensayos mostraron que mientras ZAP70 y mTOR se activaban eficientemente en respuesta a anti-CD3 en las leucemias *wild-type*, la activación de estas vías en las células KI-PRS se encontraba drásticamente reducida (**Figura 33C**).

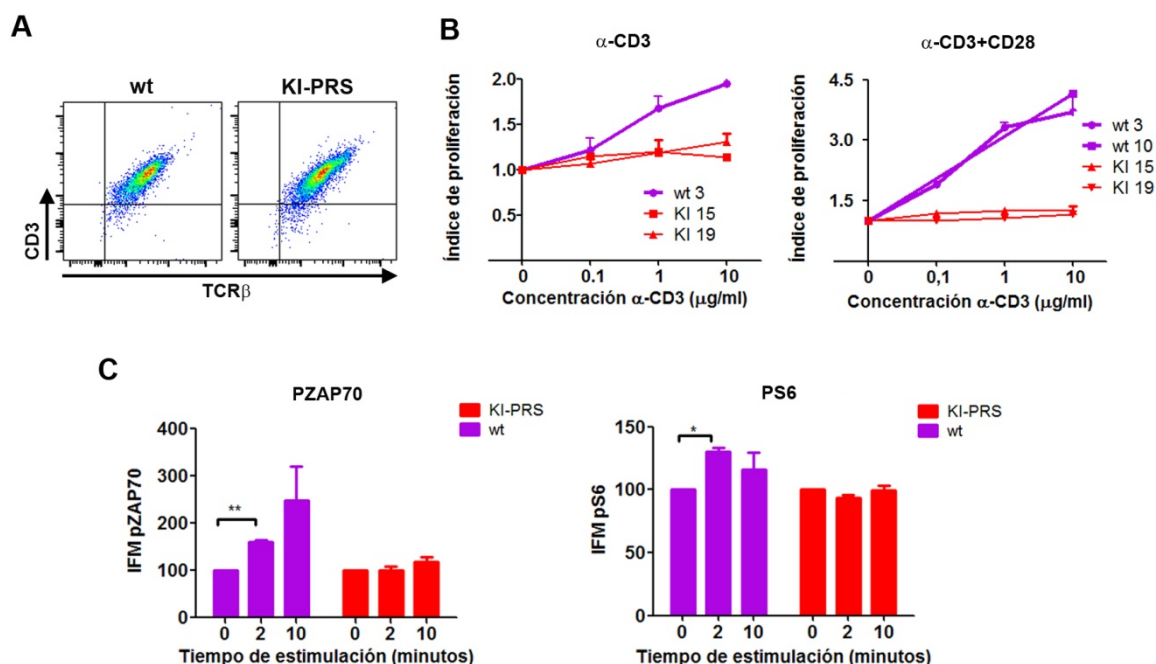


Figura 33. La inhibición del reclutamiento de Nck a CD3ε induce la deficiente señalización del complejo TCRαβ-CD3 en leucemias T-ALL dependientes de ICN1. (A) Expresión en membrana del complejo CD3-TCRαβ determinada por citometría de flujo en leucemias *wild-type* (wt) y KI-PRS generadas *in vivo*. (B) Índice de proliferación de una leucemia *wild-type* (wt) y dos leucemias KI-PRS mutantes (KI) tras 3 días de estimulación con distintas cantidades de un anticuerpo anti-CD3 en ausencia de (izquierda) o en combinación con 1μg/ml de anti-CD28 (derecha). Los datos representan la media ± SEM de dos cultivos por cada condición. (C) Fosforilación de ZAP70 (izquierda) y de S6 (derecha) en células leucémicas *wild-type* y KI-PRS, analizada por citometría de flujo como incremento en la intensidad de fluorescencia media (IFM) tras la estimulación con 10 μg/ml de anti-CD3 durante los tiempos indicados. Los datos están relativizados a un valor definido de IFM (100) en células sin estimular (tiempo 0) y representan la media ± SEM de dos cultivos por cada condición. Se indica la significación estadística de los resultados (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Para valorar las posibles consecuencias de la deficiente señalización mediada por el TCR a la progresión de la enfermedad, comparamos la capacidad inductora de leucemia, conocida como actividad LIC, de una de las leucemias mutantes generadas *in vivo* frente a una *wild-type*, tras su trasplante en un segundo huésped. El análisis de la sangre periférica a diferentes días post-trasplante demostró un retraso significativo en la aparición de células leucémicas ICN1⁺ en la sangre de los animales trasplantados con la leucemia mutante KI-PRS (**Figura 34A**). Esta mayor latencia de la enfermedad se tradujo en un mayor, aunque no significativo, tiempo de supervivencia en los ratones trasplantados con células KI-PRS, respecto a los que recibieron el mismo número de células leucémicas *wild-type* (36 días vs. 25 días; **Figura 34B**), que no se reflejó en diferencias significativas de la infiltración leucémica en la MO, el bazo o el hígado de los ratones (**Figura 34C**). Por tanto, podemos concluir que la funcionalidad de Nck

RESULTADOS

disminuye el tiempo de latencia de la enfermedad, aunque no es esencial en la patogénesis de la T-ALL.

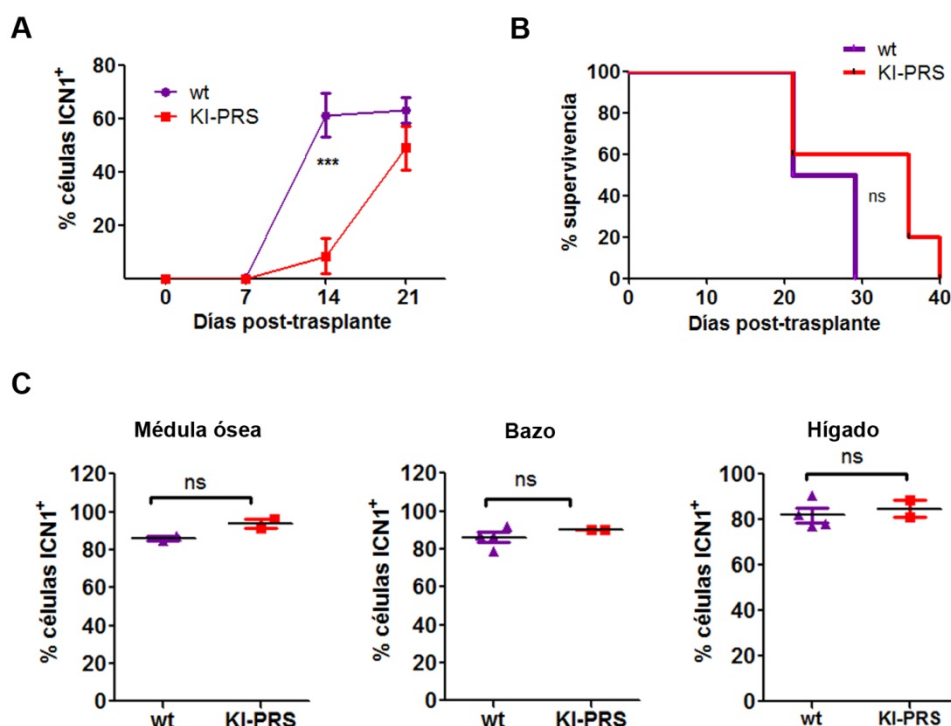


Figura 34. La señalización mediada por Nck determina el tiempo de latencia de la T-ALL dependiente de ICN1. (A) Cinética de aparición de células ICN1⁺ en la sangre de ratones trasplantados con 2×10^5 células leucémicas generadas tras el trasplante de progenitores Lin⁻ c-kit⁺ de MO *wild-type* o KI-PRS trasducidos con ICN1. Los datos están relativizados al total de células de la sangre y representan la media \pm SEM de al menos 6 ratones. Se indica la significación estadística de los resultados (***) $p < 0,001$. (B) Curva de supervivencia de los ratones en (A) trasplantados con leucemias *wild-type* vs. KI-PRS. (C) Porcentaje de células ICN1⁺ *wild-type* o KI-PRS, relativizado al total de células del órgano, en la MO, bazo e hígado de los ratones en (A) analizado en el momento del sacrificio de los ratones.

Discusión ■

Los estudios desarrollados durante los últimos diez años sobre la función de la vía de Notch en la hematopoyesis han revelado una contribución crítica de Notch1 al desarrollo de los linfocitos, en concreto, en la especificación del linaje T de los precursores linfomieloides que llegan al timo. Asimismo, la función de Notch1 se ha implicado en dos importantes puntos de control que tienen lugar durante la diferenciación intratímica, que son responsables de las dos etapas de enorme proliferación celular que acontecen en el timo (Gonzalez-Garcia et al., 2012) y que están regulados sucesivamente por dos receptores de membrana: el IL-7R (Peschon et al., 1994) y el pre-TCR (Fehling et al., 1995), respectivamente (**Figura 35**). La función de ambos receptores es la expansión de dos subpoblaciones de progenitores intratímicos en estadios sucesivos de su desarrollo: 1) tras la especificación de su destino celular, los precursores pro-T se expanden en respuesta a IL-7 para incrementar la reserva de progenitores que iniciarán los reordenamientos en el locus TCR β y 2) tras la asociación de la cadena TCR β a la subunidad pT α , el complejo pre-TCR resultante induce la selección y expansión específica de la población de células pre-T con reordenamientos TCR β productivos que van a iniciar los reordenamientos en el locus TCR α , proceso conocido como selección β (Burtrum et al., 1996; Hoffman et al., 1996), lo que favorece la diversidad del repertorio de receptores TCR $\alpha\beta$ en las células T resultantes. Aunque diversos trabajos han demostrado la asociación funcional de Notch1 con ambos procesos, la identificación de las bases moleculares de esta asociación ha sido más costosa. Recientes estudios de nuestro laboratorio han demostrado que Notch1 desempeña un papel crucial en el primer punto de control como regulador de la expansión de los progenitores pro-T, mediante la regulación transcripcional del *IL7R* (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Asimismo, pT α es una diana transcripcional de Notch1 (Reizis y Leder, 2002), cuya expresión es limitante para la activación del pre-TCR (Ramiro et al., 2001; Carrasco et al., 2001; Navarro et al., 2007) y la inducción de la selección β , en el segundo punto de control. No sólo eso, Notch1 actúa de forma sinérgica con el pre-TCR en el mantenimiento de la proliferación y supervivencia celular durante este proceso, aunque la base molecular de esta sinergia es muy discutida (Ciofani y Zuñiga-Pflücker, 2005; Maillard et al., 2006).

Considerando la función esencial de Notch1 como regulador de la expansión celular intratímica, era predecible que la desregulación de esta vía de señalización durante el proceso de diferenciación de los linfocitos T se asociaría a fenómenos de transformación celular. En efecto, alrededor del 60% de las leucemias T-ALL portan mutaciones activadoras de Notch1 (Weng et al., 2004), lo que indica que la desregulación de la activación de Notch1 en estadios madurativos críticos del desarrollo intratímico, debe ser un evento crucial en la inducción y/o progresión del programa oncogénico de la T-ALL. En consecuencia, en este trabajo hemos planteado la hipótesis de que la asociación fisiológica de Notch1 con IL-7R y pre-TCR debe extenderse al ámbito

patológico, por lo que hemos propuesto que ambos receptores deben ser cruciales en la patogénesis de la T-ALL dependiente de mutaciones activadoras de Notch1. Para estudiar esta posibilidad, hemos utilizado modelos de pérdida de función del IL-7R y pre-TCR en combinación con un modelo de inducción de T-ALL por expresión de la forma constitutivamente activa Notch1, ICN1. Los datos obtenidos han confirmado nuestra hipótesis demostrando la importancia de ambos receptores como prometedoras dianas terapéuticas.

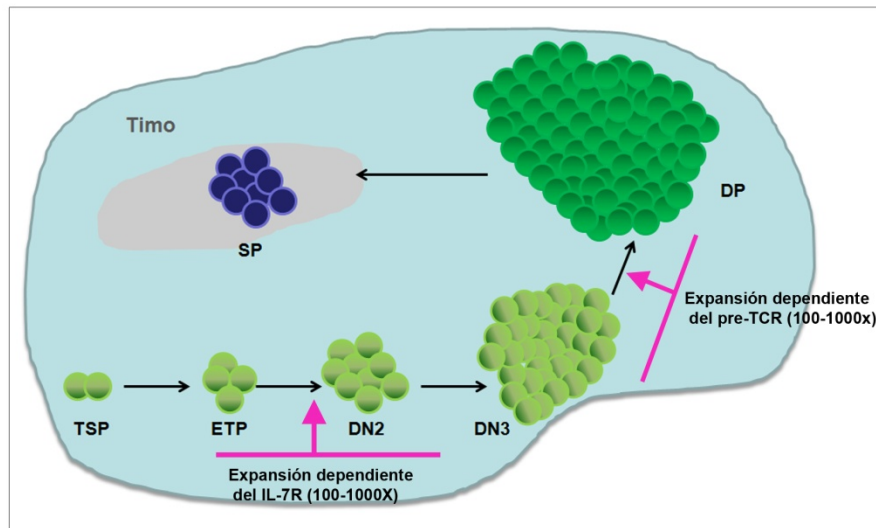


Figura 35. Diferenciación intratímica de los linfocitos T. Se muestran los dos puntos de control dependientes de la expresión del IL-7R y pre-TCR, implicados en la expansión de celular de los progenitores pro-T y pre-T, respectivamente.

1. Regulación de la expresión del IL-7R por Notch1 en el desarrollo de los linfocitos T de ratón.

Diversos estudios han señalado la implicación de la señalización a través de las vías de Notch1 y del IL-7R en el desarrollo temprano de los linfocitos T humanos y de ratón. Notch1 es esencial para la especificación del linaje T en los progenitores hematopoyéticos con potencial linfomieloide que llegan al timo (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999; De Smedt et al., 2002; Garcia-Peydro et al., 2006), mientras que la señalización mediada por el IL-7R es crucial para promover la expansión y supervivencia de estos precursores pro-T en el estadio DN (Peschon et al., 1994; Plum et al., 1996). La función estadio-específica del IL-7R se lleva a cabo mediante la regulación dinámica de su expresión, lo que permite la optimización de la respuesta frente a las cantidades limitantes de IL-7 presentes en el timo. Mientras que la subunidad γc del IL-7R se expresa constitutivamente en los progenitores más inmaduros que colonizan el timo, la

expresión de *Il7ra* en el timo de ratón se inicia en los progenitores ETP, aumenta progresivamente en los estadios DN2 y DN3 y, posteriormente, disminuye y debe terminar antes del estadio DP (Munitic et al., 2004; Yu et al., 2006); sin embargo, el mecanismo que regula esta expresión dinámica era desconocido. En humanos, nuestro grupo demostró recientemente que la expresión del *IL7R* durante las etapas iniciales de la timopoyesis está regulada transcripcionalmente por Notch1 (Gonzalez-Garcia et al., 2009), lo que sugería la existencia de un mecanismo similar en ratón. En este trabajo, nuestros estudios en ratón han confirmado la conservación evolutiva de las bases moleculares de la relación funcional de Notch1 y del IL-7R durante el desarrollo intratímico, remarcando la relevancia fisiológica de esta asociación, así como sus implicaciones patológicas.

Los datos que hemos obtenido revelan que la nueva función reguladora adscrita a Notch1 es específica del linaje T. Los estudios realizados en ratón indicaban que la transcripción del gen *Il7ra* está regulada por el factor de transcripción PU.1, tanto en los precursores linfoides tempranos y los progenitores de las células B (DeKoter et al., 2002), mientras que PU.1 es reemplazado por GABP α en las etapas finales de la diferenciación de células B (DeKoter et al., 2007). Los progenitores procedentes de la MO que migran al timo expresan PU.1; sin embargo, se requiere la pérdida de PU.1 para la progresión a lo largo del linaje T (Anderson et al., 1999). Se ha sugerido que dicha pérdida es dependiente de Notch1 (Rothenberg, 2012), pero el factor de transcripción que reemplaza a PU.1 en el linaje T para inducir la expresión de *Il7ra* no se identificó en ese momento. El presente estudio demuestra que Notch1 es el regulador de la expresión del gen que codifica para la cadena α del IL-7R (*Il7ra*) durante la diferenciación intratímica temprana en ratón y, por tanto, de la expresión de un IL-7R funcional. Al igual que en humanos, la regulación transcripcional del *Il7ra* en ratón es dependiente de la unión de RBPjk a un sitio CSL conservado en el promotor proximal del gen, como demostramos en este trabajo, y debe ser asimismo dependiente de la unión del coactivador MAML1, como se ha descrito en humanos (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Además del sitio CSL conservado en el promotor, recientemente se ha descrito un sitio alternativo de unión de CSL/RBPjk en el enhacer del gen *IL7R/Il7ra* en líneas celulares T-ALL humanas y de ratón, lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales de regulación de la expresión de IL-7R α por Notch1 conservados en ambas especies (Wang et al., 2011). En este escenario, podríamos concluir que la expresión de la subunidad IL-7R α del IL-7R en los progenitores más tempranos que llegan al timo se induciría *de novo* intratímicamente tras la señalización por Notch1, una posibilidad que concuerda con el hallazgo de niveles muy bajos o negativos de expresión de IL-7R α en los progenitores colonizadores del timo de ratón o TSP (Sambandam et al., 2005); si bien no se ha descartado la posibilidad de que *Il7ra* se induzca pretímicamente por PU.1 en una fracción minoritaria de timocitos. En cualquiera de estas situaciones, Notch1 sería el

regulador central de la expresión del IL-7R en el estadio DN; si bien en las etapas finales de la diferenciación en las que la expresión de Notch1 declina drásticamente, GABPα reemplazaría funcionalmente a Notch1 regulando la expresión del *Il7ra* en timocitos maduros (Xue et al., 2004), mientras los factores de transcripción de la familia runt, Runx1 y Runx3 (Egawa et al., 2007), y el factor FoxO1 (Kerdiles et al., 2009), serían los encargados de ejercer esta función en células T periféricas.

En cuanto a las implicaciones funcionales de la regulación del IL-7R dependiente de Notch1, los resultados obtenidos en este estudio revelan que la inhibición de Notch1 provoca un defecto en la proliferación de los progenitores DN que se correlaciona con una disminución en los niveles de IL-7Rα, lo que sugiere que, una vez que Notch1 induce la especificación del destino de los progenitores que colonizan el timo, mediante la activación de un programa transcripcional específico del linaje T (Rothenberg, 2007), su función crucial pasa a ser el control de la proliferación de las células pro-T dependiente de IL-7, mediante la regulación de la expresión de la subunidad IL-7Rα de su receptor. No obstante, nuestro estudio no demuestra de forma directa que la pérdida del IL-7R sea la responsable de la deficiente proliferación, por lo que no podemos descartar la existencia de vías de proliferación adicionales a la del IL-7R reguladas por Notch1. Para confirmar la primera posibilidad, realizamos estudios funcionales en colaboración con el grupo de Alfred Singer, utilizando timocitos DN procedentes de ratones transgénicos que expresaban *Il7ra* bajo el promotor de CD2 humano (Yu et al., 2004), en los que analizamos la proliferación tras la inhibición de la activación de Notch1 con GSI (datos no mostrados). Esperábamos demostrar que la expresión transgénica del IL-7R sería suficiente para revertir la inhibición de la proliferación inducida por GSI. Sin embargo, la expresión del transgen en estos animales se retrasaba al estadio DN2, cuando la pérdida del IL-7R endógeno ya había tenido un efecto sobre la supervivencia celular, y parecía ocurrir a unos niveles de expresión insuficientes para rescatar la proliferación de los timocitos con Notch1 inactivo. No obstante, los estudios previos de nuestro grupo indican que la expresión ectópica del IL-7R en timocitos humanos tratados con GSI revierte su defecto proliferativo en respuesta a IL-7, lo que demuestra que el eje IL-7R/IL-7 es autónomo induciendo, al menos parcialmente, la proliferación de las células pro-T en ausencia de activación de Notch. Además del efecto inhibitorio sobre la proliferación, la inhibición de la señalización por Notch1 en progenitores ETP tuvo como consecuencia el bloqueo del programa de diferenciación T. En concordancia con los datos publicados (Schmitt et al., 2004), este bloqueo fue parcial a tiempos cortos de cultivo, cuando el tratamiento con GSI a la dosis empleada fue permisivo para la diferenciación de una parte de los ETPs hasta el estadio DN2-DN3, probablemente debido a la heterogeneidad de la población ETP en la que se incluyen células que ya han activado Notch1 *in vivo*. A días posteriores, GSI inhibió la diferenciación de estos

timocitos DN2-DN3, que finalmente desaparecieron del cultivo, lo que reflejaría su incapacidad para llevar a cabo el proceso de selección β en ausencia de señalización por Notch1, como se ha descrito (Ciofani et al., 2004). Por otra parte, una población significativa de progenitores ETPs quedaron bloqueados en el estadio de diferenciación DN1 (CD44⁺CD25⁻) como consecuencia del tratamiento con GSI, y fueron incapaces de progresar en su programa de diferenciación. Aunque estas células debían corresponder a progenitores tempranos linfomieloides, con capacidad de generar células de linajes no-T, no observamos esta generación en las condiciones de cultivo empleadas, probablemente debido a la falta de suplementación con citoquinas específicas de tales linajes. En conjunto, nuestro estudio señala al IL-7R como uno de los efectores de Notch1, con una función esencial en el control de la supervivencia y proliferación de la población de progenitores pro-T, necesaria para asegurar la generación de un número óptimo de timocitos pro-T que realicen posteriormente con éxito el proceso de selección β , generando un repertorio eficiente de linfocitos T.

2. Cooperación del IL-7R y Notch1 en la patogénesis de la T-ALL.

En segundo lugar, hemos analizado en nuestro estudio la relevancia patológica de nuestro hallazgo sobre la regulación transcripcional del IL-7R por Notch1 en el desarrollo intratímico. En concreto, quisimos analizar la posibilidad de la existencia de un mecanismo de regulación similar durante la patogénesis de la T-ALL inducida por mutaciones activadoras de Notch1. Estudios previos de diferentes grupos habían descrito la expresión del IL-7R en una alta proporción de T-ALL humanas (revisado en Ribeiro et al., 2013), y nuestro grupo demostró la relación funcional del IL-7R con la vía de Notch1 en líneas T-ALL humanas (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Este hallazgo sugería la posibilidad de que el IL-7R pudiera estar desempeñando una función relevante en la fisiopatología de la T-ALL. La confirmación de esta hipótesis demandaba el uso de estrategias alternativas a las empleadas en los estudios convencionales realizados en líneas celulares humanas o en muestras primarias de T-ALL procedentes de pacientes, donde es difícil valorar de forma retrospectiva la contribución al proceso oncogénico de mecanismos moleculares concretos, y separarlos de alteraciones genéticas adicionales no relacionadas con la patogénesis de la enfermedad, o que incluso pueden adquirir las líneas celulares durante su cultivo *in vitro*. Por ello, para explorar la contribución del IL-7R a la patogénesis de la T-ALL dependiente de Notch1 decidimos emplear un modelo de generación de T-ALL *in vivo*, basado en el modelo descrito de sobre-expresión de ICN1 en progenitores de MO de ratón (Pear et al., 1996). En este modelo hemos confirmado la expresión aberrante de IL-7R funcionales en las células leucémicas ICN1⁺ generadas y, en concreto, en la población mayoritaria DP, que en condiciones fisiológicas carece de la expresión del IL-7R, lo que sugiere que Notch1 induce la expresión de receptores

funcionales para IL-7 en situaciones patológicas. De hecho, observamos una correlación directa en estas células entre los niveles de expresión del IL-7R en la superficie celular y los de Notch1 activo, reflejada en los niveles de GFP. Aunque no hemos confirmado formalmente que el IL-7R es una diana transcripcional de Notch1 en la T-ALL de ratón, esta confirmación se deriva de nuestros trabajos previos utilizando líneas celulares y leucemias primarias T-ALL humanas, en las que la inhibición de la activación de Notch1 por GSI resulta en la desaparición específica de los transcritos *IL7R* y de los receptores de la membrana (Gonzalez-Garcia et al., 2009 y datos no mostrados). El modelo de ratones deficientes para *Il7ra* en el linaje T confirmó asimismo la contribución directa del IL-7R al proceso de generación de la leucemia, demostrando la incapacidad de ICN1 para inducir T-ALL a partir de progenitores de MO que no pueden expresar un IL-7R funcional. Por tanto, el IL-7R funciona como un mediador crucial de Notch1 en la patogénesis de la T-ALL, probablemente activando vías de señalización críticas durante el proceso oncogénico. Entre las vías de señalización mediadas por el IL-7R, la vía PI3K es el principal mecanismo efector por el cual el IL-7R contribuye a la proliferación de las T-ALL (Barata et al., 2004b). Su activación tiene como consecuencia la promoción de la supervivencia mediante el incremento de los niveles de Bcl2, la progresión del ciclo celular por degradación de p27 e hiperfosforilación de Rb y el incremento en el metabolismo de la glucosa, tras la inducción de la expresión del transportador Glut1. Acorde con una participación de la vía PI3K/AKT en la oncogénesis dependiente de Notch1, nuestros resultados demuestran que las células leucémicas ICN1⁺ aisladas *ex vivo* del bazo de los ratones presentaban una activación basal de dicha vía, que podría reflejar la activación *in vivo* de la ruta por la IL-7, y que AKT se activaba adicionalmente en respuesta a IL-7 en ensayos *in vitro*. Asimismo, la activación constitutiva de AKT en las T-ALL podría inducirse directamente por la activación de Notch1, que regula negativamente la expresión de su diana PTEN, como se ha demostrado en T-ALL humanas (Palomero et al., 2007). Por tanto, el IL-7R cooperaría durante el proceso oncogénico con ICN1 por un mecanismo de convergencia de ambas vías de activación en un efector común, AKT, implicado en supervivencia y proliferación celular.

Se ha descrito que la generación de la leucemia inducida por la activación aberrante de Notch1 se inicia con un evento pre-leucémico consistente en la generación ectópica de progenitores de células T en la MO y la inducción de un proceso linfoproliferativo (Allman et al., 2001). En modelos de sobre-expresión de mutaciones activadoras débiles de Notch1 que inducen un nivel de señalización menor que ICN1, se ha demostrado que la generación final de la leucemia depende de la adquisición de mutaciones adicionales en la población pre-leucémica (Chiang et al., 2008). Considerando que la señalización mediada por el IL-7R se inicia en un estadio madurativo temprano de la diferenciación de los linfocitos T (Haks et al., 1999), es posible que la expresión del IL-7R contribuya de forma crítica al proceso

linfoproliferativo pre-leucémico y a la generación de una población de progenitores susceptible de sufrir mutaciones adicionales. Por tanto, puede interpretarse que el defecto en la generación de leucemia en los ratones KO para IL-7R es debido al defecto intrínseco de estos progenitores para mantener su supervivencia y para proliferar en la MO, más que a un efecto proto-oncogénico del IL-7R. Sin embargo, este defecto es específico de las células que sobre-expresan ICN1 sin que se vea afectada la capacidad de reconstitución de la periferia con células no transducidas mieloides en los ratones trasplantados.

Aunque el modelo de generación de T-ALL en ratón ha demostrado ser muy relevante para el estudio de la patogénesis de esta enfermedad; uno de los grandes retos que se nos plantean es la validación de los resultados obtenidos en el sistema humano. Datos de nuestro grupo han puesto de manifiesto recientemente que, a diferencia de lo que ocurre en ratón, la sobre-expresión de ICN1 en HSCs humanas no es suficiente para la inducción de T-ALL en ratones trasplantados (García-Peydró *et. al*, en revisión). En su lugar, ICN1 induce la generación de una población DP ectópica pre-leucémica que desaparece de la MO a 10 semanas pos-trasplante, lo que indica que la mutación ICN1 es insuficiente para generar T-ALL humana en el huésped. Asimismo, las mutaciones activadoras de *NOTCH1* identificadas en pacientes con T-ALL son insuficientes para generar T-ALL cuando se sobre-expresan en ratón. Estos mutantes débiles son, sin embargo, capaces de cooperar con otros oncogenes, como K-ras^{G12D}, acelerando el proceso oncogénico y contribuyendo a la transformación celular (Chiang et al., 2008). Por tanto, la señalización aberrante de Notch1 podría representar un evento pre-leucémico en la patogénesis de la enfermedad humana, que daría lugar a la generación de una población aberrante susceptible de sufrir mutaciones oncogénicas posteriores. Este evento tiene lugar durante la diferenciación intratímica y, puesto que la T-ALL se caracteriza por un alto grado de infiltración de la MO por los linfoblastos T, las células pre-leucémicas migrarían a la MO, donde ocurriría la transformación oncogénica posterior. Esta posibilidad ha sido confirmada por datos recientes de nuestro laboratorio, que han proporcionado evidencias de la implicación de ICN1 en la colonización de la MO por las células pre-leucémicas a través de la regulación de la molécula de adhesión CD44 (García-Peydró *et. al*, en revisión). En la MO, la expansión de la población pre-leucémica dependiente del IL-7R sería crítica en la generación de la enfermedad.

A pesar de que el cáncer es una enfermedad genética, numerosas evidencias indican la participación del microambiente tumoral en la progresión de la enfermedad. En el caso concreto de la T-ALL, se ha sugerido la implicación de la IL-7 producida por el estroma medular en este proceso (revisado en Ribeiro et al., 2013). Conforme a esta posibilidad, nuestros estudios han puesto de manifiesto la funcionalidad del IL-7R en las

T-ALL primarias, ya que su proliferación en cultivos sobre estroma OP9 se potencia en presencia de IL-7 exógena, aunque se observó proliferación basal de la leucemia, incluso cuando no se adicionaba IL-7. Si bien estos datos podrían sugerir la proliferación leucémica independiente de la citoquina, la producción endógena de IL-7 por parte de la línea estromal OP9 descrita en otros estudios (Cho et al., 1999; Wang et al., 2006), no apoyaría esta posibilidad. Por tanto, nuestros resultados *in vitro* concuerdan con los datos obtenidos sobre la implicación de la vía IL-7R/IL-7 en la progresión de la T-ALL *in vivo*. De hecho, la estrategia de silenciamiento del IL-7R mediante el empleo de horquillas de ARN, confirmó un efecto drástico de la pérdida del IL-7R en la inhibición de la proliferación de las células leucémicas *in vivo* y de la progresión de la enfermedad. No obstante, el silenciamiento del IL-7R no fue completo, a juzgar por la expresión de niveles bajos del IL-7R en la superficie de las células residuales portadoras del shRNA frente al *IL7R*, por lo que no podemos establecer si la señalización por el IL-7R es un requerimiento absoluto para el mantenimiento de las células leucémicas dependientes de ICN1. En conclusión, el IL-7R parece ser esencial no sólo en la generación, sino también en la progresión *in vivo* de la T-ALL, aunque no se puede descartar la posible contribución a estos procesos de otras señales liberadas por el microambiente leucémico. De hecho, se ha reportado la interacción de las células leucémicas a través de la molécula de adhesión LFA-1 con su ligando ICAM-1 expresado por las células estromales, lo que contribuye a su supervivencia (Winter et al., 2001). También se ha descrito que, en algunas T-ALLs primarias, la proliferación inducida por la IL-7 puede ser potenciada por otras citoquinas pertenecientes a la familia de citoquinas cuyos receptores comparten la cadena γ_c , como la IL-2, IL-4, IL-9 e IL-15, sugiriendo un efecto sinérgico *in vivo* (Barata et al., 2004a). A favor de un requerimiento absoluto del IL-7R para la proliferación de las T-ALL, un trabajo de nuestro laboratorio demostró que la expresión ectópica de IL-7R α rescata la proliferación tras la inhibición de Notch1 en respuesta a IL-7 en una línea celular T-ALL (Gonzalez-Garcia et al., 2009). Asimismo, la posibilidad de que las T-ALL primarias humanas con mutaciones en Notch1 sean estrictamente dependientes de la señalización por el IL-7R ha sido demostrada en estudios *in vitro* empleando un anticuerpo bloqueante frente al IL-7R, e *in vivo*, en experimentos que demostraron que la inhibición específica de la expresión del IL-7R mediante el uso de shRNA, tiene como consecuencia la reducción del potencial oncogénico de las leucemias humanas, tal y como hemos demostrado en este trabajo para leucemias de ratón. Por tanto, nuestros datos en conjunto indican que Notch1 contribuye al mantenimiento de niveles altos del IL-7R, lo que permite responder más robustamente a la IL-7 endógena que se expresa por el microambiente leucémico en concentraciones limitantes, presentadas por la matriz extracelular (Ariel et al., 1997), favoreciéndose así la proliferación leucémica. En consecuencia, la expresión del IL-7R no es sólo crucial durante el proceso de generación de la leucemia, sino que, una vez generada, las señales inducidas por la IL-7 son esenciales para la progresión tumoral.

La presencia de cantidades limitantes de IL-7 en el organismo plantea un reto a los argumentos que apoyan la dependencia de las células leucémicas de la IL-7 para su proliferación. Sin embargo, existen diversos mecanismos que permiten maximizar la disponibilidad de IL-7 por las células T para garantizar la homeostasis y la expansión clonal en respuesta a antígeno. Dichos mecanismos limitan la expresión de IL-7R α en la superficie de las células T tras su estimulación con IL-7 mediante la supresión de la transcripción del *IL7ra* (Park et al., 2004) y la endocitosis de IL-7R α (Henriques et al., 2010), hallazgos que han dado lugar a la llamada "hipótesis altruista" del consumo de la IL-7 (Mazzucchelli y Durum, 2007). Cabe esperar, que los mismos mecanismos que funcionan en las células T en condiciones fisiológicas operen en las células leucémicas, favoreciendo la proliferación del máximo número posible de linfoblastos en situaciones patológicas. Conforme a esta posibilidad, el grupo del Dr. J. Barata ha proporcionado evidencias que indican que las células leucémicas recién aisladas de pacientes expresan niveles de ARNm de *IL7R* significativamente menores que los precursores T normales (Silva et al., 2011). Se ha postulado que otro mecanismo de optimización de la IL-7 disponible *in vivo* consistiría en la presentación de la citoquina por la matriz extracelular a las células portadoras del IL-7R en concentraciones locales, suficientes para inducir su función proliferativa (Ariel et al., 1997). En este caso, la interacción de la leucemia con los componentes del nicho tumoral en la MO sería crucial para el mantenimiento y la progresión de la enfermedad y su manipulación constituiría una posible estrategia de intervención terapéutica.

Aunque nuestros estudios se han centrado en la contribución del IL-7R a la patogénesis y progresión de la T-ALL con mutaciones en la vía de Notch1, trabajos recientes han demostrado que el IL-7R puede actuar como un oncogen *per se* induciendo la generación de leucemia independientemente de Notch1. En efecto, alrededor del 10% de los pacientes de T-ALL portan mutaciones de ganancia de función en el gen *IL7R* (Shochat et al., 2011; Zenatti et al., 2011), que no se han asociado con mutaciones concomitantes en *NOTCH1* (Shochat et al., 2011), lo que refuerza la relevancia patológica de esta vía proliferativa. Estas mutaciones activadoras en el *IL7R* confieren a las células la capacidad de señalizar de forma constitutiva, mediante la formación de homodímeros de IL-7R α , independiente de su unión a la IL-7. El potencial oncogénico del IL-7R mutado no parece residir en la inducción de cascadas de activación celular y rutas metabólicas distintas al receptor *wild-type*, aunque este aspecto se está investigando actualmente en nuestro laboratorio con fines terapéuticos.

La mayor parte de los estudios realizados sobre la fisiopatología de la T-ALL y, en general, sobre cualquier tipo de cáncer, se han llevado a cabo sobre el total de células

que componen el tumor, que mayoritariamente constituyen la progenie no tumorogénica de las células madre cancerígenas, también llamadas, en el caso de la leucemia, células iniciadoras de la leucemia o LICs. Dado que las LICs constituyen una sub-población leucémica funcional y biológicamente distinta al resto (Wang y Dick, 2005), uno de los principales retos en el campo de la oncología moderna es la identificación y caracterización de dichas células. En el caso de la T-ALL se ha propuesto la implicación de Notch1, así como de algunas de sus dianas, en el mantenimiento de la auto-renovación, la supervivencia y la proliferación de las LICs (Armstrong et al., 2009; Medyouf et al., 2011; Roderick et al., 2014). Nuestros ensayos de trasplantes seriados de las leucemias primarias han puesto de manifiesto que los clones de células T-ALL con mayor expresión del IL-7R poseen una ventaja que permite su selección y propagación *in vivo*. La mayor expresión del IL-7R en la membrana podría favorecer la retención o estabilización de la IL-7 en la superficie celular y, por tanto, optimizar la duración de la señal de supervivencia y proliferación (Mazzucchelli y Durum, 2007), lo que resultaría en la selección *in vivo* de las células leucémicas con mayores niveles del IL-7R. Conforme a esta posibilidad, pudimos establecer una correlación entre la expresión de IL-7R α y la actividad LIC, lo que sugiere que el IL-7R participa en la supervivencia y/o auto-renovación de las LICs y sería, por tanto, un potencial marcador de LICs. No obstante, como hemos mencionado anteriormente, los mayores niveles del IL-7R se correlacionaban en estas células con mayores niveles de ICN1, lo que podría sugerir que la selección viene determinada por la señalización de Notch1, independientemente del IL-7R. En contra de esta posibilidad, nuestros experimentos con un shRNA frente al *IL7R* mostraron que el bloqueo de la progresión leucémica *in vivo* correlacionaba con la bajada en los niveles de expresión del IL-7R independientemente de los niveles de Notch1 activo. En la actualidad, se están realizando experimentos dirigidos a confirmar esta hipótesis, mediante la administración *in vivo* de un anticuerpo bloqueante frente al IL-7R y el análisis de su valor terapéutico en la eliminación o reducción de la frecuencia de LICs en T-ALLs con mutaciones en la vía de Notch1.

3. Implicación de la expresión y función del pre-TCR y TCR $\alpha\beta$ en la T-ALL inducida por ICN1.

El requerimiento de la función del pre-TCR durante la patogénesis de la T-ALL con mutaciones en la vía de Notch1 ha sido ampliamente discutido. Mientras que inicialmente se propuso una función esencial del pre-TCR durante el proceso oncogénico dependiente de ICN1 (Allman et al., 2001), estudios posteriores abogaron por una función cooperativa de ambos receptores, más que por un requerimiento absoluto del pre-TCR por parte de Notch1 (Asnafi et al., 2003; Campese et al., 2006). Sin embargo, en contra de esta última posibilidad, se ha demostrado más recientemente que, si bien

Notch1 y el pre-TCR actúan de forma sinérgica para mantener la proliferación y la supervivencia de los timocitos DN durante la selección β , ambas funciones son esenciales e independientes durante este proceso (Ciofani y Zuñiga-Pflücker, 2005; Maillard et al., 2006). Por tanto, la controversia sobre la importancia del pre-TCR en la fisiopatología de la T-ALL dependiente de ICN1 permanece abierta. Diversas razones pueden dar cuenta de la obtención de resultados controvertidos en este tema, entre otras, el empleo de modelos animales diversos en los que se ha analizado la generación de T-ALL en células incapaces de expresar el pre-TCR en la superficie celular. Sin embargo, en ninguno de ellos se ha abordado la función concreta de la señalización a través del pre-TCR en la patogénesis de la T-ALL.

En un intento por esclarecer el papel del pre-TCR en la inducción del proceso oncogénico de las T-ALLs con mutaciones activadoras en la vía de Notch1, así como de estudiar de forma directa la contribución de la señalización a través del pre-TCR al proceso leucemogénico, empleamos un nuevo modelo de ratón, C80G. En este modelo, los timocitos DN3 expresan el complejo pre-TCR en la membrana, pero éste es incapaz de adoptar un estado conformacional activo debido a una mutación puntual en un residuo de la cadena CD3 ϵ (C80), y como consecuencia la señalización mediada tanto por el pre-TCR, como por el TCR $\alpha\beta$ maduro, se encuentra abolida (Blanco et al., 2014). El estudio indicó que la expresión del complejo pre-TCR en la membrana celular no es suficiente para soportar la inducción de leucemia por sobre-expresión de ICN1, y que la señalización a través del pre-TCR es el evento crítico en el proceso. Estos resultados contrastan con los del grupo de H. von Boehmer (Campese et al., 2006), que mostraron que la sobre-expresión de ICN1 en progenitores *Rag2*^{-/-} de MO reproduce la generación ectópica de células DP ICN1⁺ y el desarrollo de una T-ALL, tal y como se describió en el modelo inicial (Pui et al., 1999), si bien con una cinética retrasada. Sin embargo, la mutación activadora ICN1 utilizada en la mayoría de los estudios difiere de la empleada en este último trabajo, en el que se utilizó una mutación ICN1 de ratón, en lugar de humana, que podría resultar en una activación mayor de la vía de Notch1. La señalización a través de ambos receptores, Notch1 y el pre-TCR, activa dianas comunes como NF- κ B e interfiere con la actividad de E2A. Ambos eventos son críticos durante el proceso de selección β , por lo que se podría argumentar que la activación inducida por una mutación activadora fuerte de Notch1 sería capaz de mimetizar y, por tanto, sustituir a las señales aportadas por el pre-TCR y permitir la proliferación y la progresión de algunas células al estadio DP de una forma pre-TCR independiente. La sobreexpresión de ICN1 en las células de los ratones C80G también resultó en la generación de células DP en el timo en nuestros experimentos, en contraste con las células ICN1⁻, que dieron lugar a timocitos bloqueados en el estadio DN3, recapitulando lo que ocurre en el timo de estos ratones. Sin embargo, estas células DP no expresaban en su membrana el complejo TCR $\alpha\beta$ maduro, lo que indica que no habían sufrido el proceso de selección β y

que su diferenciación había tenido lugar en ausencia de señalización por el pre-TCR, probablemente debido a la sobre-activación de la vía de Notch1, como ya hemos mencionado. Si bien los niveles altos y mantenidos de Notch1 permitieron que los timocitos C80G generaran células DP, estos niveles no fueron suficientes para inducir una transformación oncogénica de los mismos. Por tanto, la sobre-expresión de ICN1 es suficiente para la generación de células DP aberrantes; sin embargo, la transformación oncogénica mediada por ICN1 requiere la expresión de un pre-TCR funcional, sugiriendo que la señalización a través del pre-TCR proporciona un contexto permisivo para la aparición de mutaciones adicionales necesarias para la transformación oncogénica. Se ha descrito una función similar del pre-TCR en un modelo de leucemia inducida por los oncogenes LMO1 y SCL, donde la proliferación inducida por el pre-TCR contribuye a la transformación oncogénica de una población pre-leucémica (Tremblay et al., 2010). Colectivamente, nuestros datos indican que, aunque la expansión celular inducida por el IL-7R es un evento necesario para la transformación tumoral, la expresión del IL-7R no es suficiente para inducir T-ALL en ausencia de un pre-TCR funcional, poniendo de manifiesto el requerimiento absoluto e independiente del IL-7R y pre-TCR durante la patogénesis de la T-ALL dependiente de Notch1.

Es preciso destacar que la sobre-expresión de ICN1 en ausencia de un pre-TCR funcional no dio lugar a la generación y transformación tumoral de células del linaje T $\gamma\delta$, cuya diferenciación no es dependiente de la señalización por el pre-TCR (Blanco et al., 2014). Tampoco se observó la transformación oncogénica en otros linajes hematopoyéticos, ya que el trasplante secundario de las células ICN1⁺ C80G con fenotipo B no estableció la enfermedad en los nuevos huéspedes. Por tanto, nuestros resultados, en concordancia con los de otros autores (Allman et al., 2003), evidencian que el potencial oncogénico de Notch1 en este modelo se limita a células del linaje T, y particularmente, a progenitores capaces de señalizar a través del pre-TCR.

Un aspecto novedoso de nuestro trabajo es que pone de manifiesto la relevancia de la conformación activa del pre-TCR, y en concreto, del residuo C80 de la cadena CD3 ϵ , en la patogénesis de la T-ALL. Por tanto, el estudio de la contribución al proceso oncogénico de las vías de señalización y mecanismos moleculares asociados a este estado conformacional es de crucial importancia por su potencial empleo como dianas terapéuticas. El paradigma molecular en el que se han analizado las rutas de señalización activadas como consecuencia de esta conformación activa es el TCR $\alpha\beta$, cuya activación inducida tras el reconocimiento antigénico resulta en el cambio conformacional que determina esta conformación. Una de las moléculas cuya función es dependiente de la conformación activa del este complejo TCR es la proteína adaptadora Nck, que es reclutada a la región intracelular de la cadena CD3 ϵ como consecuencia del cambio conformacional. Con el objetivo de evaluar la importancia de la unión de la proteína Nck

a la cadena CD3 ϵ del pre-TCR en el proceso oncogénico dependiente de ICN1, estudiamos el potencial oncogénico de progenitores de MO procedentes de ratones *Knock-in* para la secuencia de unión de Nck, que impide la unión de Nck a CD3 ϵ , en los que se sobre-expresó ICN1, en comparación con progenitores *wild-type*. Los resultados obtenidos indicaron que las leucemias se generaban con una cinética y agresividad similar, sugiriendo que la unión de Nck a la cadena CD3 ϵ es prescindible durante la patogénesis de la T-ALL dependiente de Notch1. Dado que la unión de Nck al TCR participa en la activación de ZAP70, estos datos sugieren que la vía de ZAP70, y, en consecuencia, las vías de señalización activadas por ZAP70 entre las que se encuentran la vía MAPK/ERK, que induce la inhibición de E2A; la de PLC γ , que conduce a la activación de los factores de transcripción NFAT y NF- κ B; y la vía de Rac, no son limitantes en el proceso oncogénico dependiente de ICN1 y, por tanto, otras vías independientes de Nck, pero dependientes del cambio conformacional, estarían implicadas en el proceso oncogénico inducido por ICN1. No obstante, es preciso destacar que en las células mutantes, la inhibición de la activación de ZAP70 no es completa, por tanto, los bajos niveles de activación remanentes podrían ser suficientes para transmitir la señalización inducida vía pre-TCR. Otra posibilidad compatible con la anterior sería que la activación de Notch1 es suficiente *per se* para compensar la señalización reducida del pre-TCR como consecuencia de la ausencia de reclutamiento de Nck, ya que Notch1 es capaz de activar dianas comunes con el pre-TCR a través de rutas alternativas. En concreto, Notch1 inhibe E2A a través de las MAP quinasas p42/p44, promoviendo su ubiquitinación y degradación (Nie et al., 2003). Asimismo, activa la vía de señalización de NF- κ B a través de Hes1, mediante la represión de la deubiquitinasa *CYLD*, que es un regulador negativo de la vía (Espinosa et al., 2010). Estos datos reflejan que la transformación oncogénica por ICN1 y pre-TCR tendría lugar a través de la activación de múltiples vías distintas que actuarían de forma sinérgica.

Aunque el defecto en la unión de Nck al complejo pre-TCR no parecía ser limitante en la patogénesis de la T-ALL dependiente de ICN1, quisimos investigar su participación en la progresión *in vivo* de la enfermedad. Los trasplantes seriados pusieron de manifiesto la generación de la enfermedad con la misma penetrancia que las leucemias *wild-type*, pero con un mayor tiempo de latencia, lo que sugiere un posible papel modulador del TCR $\alpha\beta$ en la actividad LIC de la leucemia, que podría estar reducida en las células que portaban la mutación. No obstante, el efecto de la mutación podría ser mayor y estar enmascarado por una frecuencia elevada de LICs en nuestros experimentos. Por tanto, se requieren futuros estudios de trasplantes seriados en condiciones de dilución límite para valorar la frecuencia de LICs en condiciones *wild-type* y mutantes.

4. Nuevas perspectivas terapéuticas en el tratamiento de la T-ALL.

El pronóstico de los pacientes de T-ALL ha mejorado notablemente en los últimos años debido al desarrollo de tratamientos de quimioterapia intensiva. Sin embargo, la frecuencia de recaídas sigue siendo muy elevada y la supervivencia de estos pacientes es baja, por lo que la T-ALL continúa teniendo un mal pronóstico en aproximadamente el 50% de los casos en adultos. Por ello, en la actualidad, los esfuerzos se están centrando en el diseño de terapias más específicas que permitan evitar las recidivas y aumentar la supervivencia de los pacientes. Tales estrategias deberían estar dirigidas a la eliminación de las LICs, últimas responsables de las recaídas, que suelen ser refractarias a los tratamientos de quimioterapia convencionales.

La alta prevalencia de mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1* presentes en las T-ALL ha promovido en el pasado reciente el diseño de terapias dirigidas frente a la vía de señalización de Notch1. La primera aproximación terapéutica que se planteó fue el tratamiento de pacientes con GSI, pero ésta ha sido cuestionada por dos motivos principales. El primero de ellos, debido a su excesiva toxicidad intestinal; y el segundo, motivado por los múltiples mecanismos de resistencia que se han identificado. En concreto, las mutaciones en el gen *PTEN*, que provocan un defecto en la expresión del gen o la pérdida de la función de la proteína, se han asociado a resistencias al tratamiento con GSI (Palomero et al., 2007). Un trabajo reciente ha revelado que las células resistentes a GSI poseen un estado epigenético único y que el tratamiento con un inhibidor de BRD4, JQ1, proteína perteneciente a la familia de proteínas BET que actúan como reguladores epigenéticos, muestra un efecto sinérgico con GSI (Knoechel et al., 2014), indicando que el uso de GSI en combinación con moduladores epigenéticos puede abrir nuevas oportunidades terapéuticas. Asimismo, el conocimiento de las múltiples vías oncogénicas activadas por Notch1 ofrece la posibilidad de que los inhibidores de Notch sean potencialmente combinados con inhibidores del ciclo celular, de las vías PI3K/AKT y de NF- κ B para mejorar su eficacia o evitar la resistencia al tratamiento (Roti y Stegmaier, 2014). Otro tipo de aproximaciones en desarrollo en la actualidad consisten en el diseño de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a Notch1 y sus ligandos (Liu et al., 2011; Hernandez Tejada et al., 2014), que tienen como objetivo reducir o eliminar la toxicidad gastrointestinal asociada a la inhibición de todos los receptores Notch. Otra alternativa son los péptidos sintéticos que contienen el dominio de interacción de MAML1 con ICN1 y actúan como un dominante negativo de MAML1 bloqueando la unión a ICN1 (Moellering et al., 2009; Liu et al., 2011). Aunque los estudios preclínicos han mostrado la efectividad de estos tratamientos, se requieren ensayos clínicos para determinar si el nivel de inhibición de Notch1 que inducen es suficiente para obtener respuestas terapéuticas en pacientes con T-ALL. En la actualidad

se están llevando a cabo ensayos clínicos con varios compuestos con actividad GSI y con anticuerpos frente a Notch1.

La regulación del *IL7R* por Notch1 en más del 50% de las leucemias T, y la confirmación de que la vía de señalización mediada por el IL-7R está activa en las T-ALL, resaltan esta vía como una prometedora diana de intervención terapéutica. En nuestro trabajo hemos corroborado la implicación de este receptor en la progresión tumoral *in vivo* de las T-ALLs con mutaciones en Notch1, y hemos abordado el potencial terapéutico del bloqueo del IL-7R en estas leucemias mediante el uso de vectores lentivirales que portan un shRNA frente al *IL7R*. Los resultados obtenidos en el modelo de ratón, junto con los datos recientes del laboratorio en leucemias humanas portadoras de este tipo de mutaciones (en preparación), demuestran que la inhibición de la expresión del IL-7R reduce drásticamente la progresión oncogénica de la T-ALL. En los últimos años, la inmunoterapia del cáncer se ha perfilado como una de las estrategias más innovadoras en el tratamiento de diferentes tipos de tumores, incluyendo las leucemias, por lo que en pacientes con T-ALL, la inhibición del IL-7R podría realizarse con anticuerpos bloqueantes, tal y como se realiza en leucemias de tipo B, particularmente, en linfomas no-Hodgkin en los que el tratamiento basado en el uso de un anticuerpo monoclonal frente al antígeno CD20 (rituximab) expresado en los linfocitos B ha mostrado ser altamente eficaz. Recientemente, hemos establecido una colaboración con la compañía de biotecnología Amgen para el uso de un anticuerpo monoclonal frente al IL-7R de ratón (M595), que nos permitirá obtener la prueba de concepto sobre la eficacia *in vivo* de la terapia con anticuerpos bloqueantes del IL-7R. El siguiente paso será el establecimiento de modelos preclínicos humanos de tratamiento terapéutico en ratones inmunodeficientes xenotrasplantados con T-ALLs humanas para su traslado a un ensayo clínico. Uno de los efectos adversos de este abordaje terapéutico es que el tratamiento puede dar lugar a la inmunosupresión del paciente dado que la proliferación homeostática de los linfocitos T periféricos depende en gran medida de la señalización a través del IL-7R (Schluns et al., 2000). Sin embargo, teniendo en cuenta el contexto clínico de la leucemia aguda, la duración relativamente corta de la terapia, la inmunosupresión producida por la quimioterapia y la capacidad de auto-renovación del sistema linfoide, este efecto secundario podría ser aceptable. Actualmente, se está evaluando en un ensayo clínico en fase I (NCT02293161) la seguridad y las propiedades biológicas de un anticuerpo monoclonal humanizado frente al IL-7R (GSK2618960) en el tratamiento de la esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune en la que se ha descrito la implicación de la señalización por el IL-7R (Mazzucchelli et al., 2012). Por tanto, su uso podría extenderse en un futuro al tratamiento de la T-ALL. Asimismo, datos de nuestro laboratorio indican que las leucemias primarias linfoblásticas agudas de tipo B, B-ALLs, frecuentemente expresan IL-7R y que éste participa en la proliferación tumoral *in vivo*,

por lo que el tratamiento con anticuerpos monoclonales frente al IL-7R podría constituir una terapia universal para las ALLs, tanto de linaje T como B.

Los resultados expuestos sobre el papel esencial que el pre-TCR desempeña en la leucemogénesis de células T inducida por Notch1, así como el hallazgo de que el 50% de las leucemias T-ALL humanas presentan una sobre-expresión del gen pT α (Bellavia et al., 2002; Asnafi et al., 2003) e incluso algunas, la expresión en membrana del pre-TCR (Fuentes *et al.*, en preparación), sugieren la posibilidad de que el pre-TCR sea una diana específica de intervención terapéutica en los tratamientos antitumorales en pacientes con T-ALL. En esta línea, muy recientemente se ha demostrado en ensayos *in vitro* que leucemias B-ALL con expresión de pre-BCR son sensibles al tratamiento con inhibidores de SYK, proteína de la familia de ZAP70 y estructuralmente relacionada, a inhibidores de PI3K y a inhibidores de quinasas de la familia SRC (Geng et al., 2015). Por tanto, el uso de inhibidores específicos de moléculas implicadas en la vía de señalización del pre-TCR podría ser eficaz en el tratamiento de T-ALLs humanas con expresión de pre-TCR. Asimismo, en este tipo de leucemias podría aplicarse una estrategia terapéutica basada en el tratamiento con anticuerpos monoclonales en la que la diana sería el complejo pre-TCR. Puesto que este receptor se expresa específicamente por los linfocitos T en un estadio concreto de su desarrollo y de manera transitoria, y no por otros tipos celulares, la utilización de anticuerpos frente a este receptor reduciría en gran medida los efectos adversos provocados por los agentes quimioterapéuticos comunes. En este sentido, nuestro laboratorio ha desarrollado un anticuerpo monoclonal frente al pre-TCR humano que emplearemos en el futuro para determinar la idoneidad del pre-TCR como diana terapéutica (Ramiro et al., 2001).

Como ya hemos mencionado, el éxito de cualquier terapia futura dependerá de la identificación y eliminación eficiente de las LICs, ya que la mayoría de las recaídas de la T-ALL ocurre en fases tempranas post-tratamiento y reflejan la resistencia al mismo de las LICs. Los mecanismos que podrían explicar la mayor resistencia de las LICs al tratamiento quimioterapéutico son la quiescencia, ya que se ha demostrado que al menos una parte de las células madre tumorales son quiescentes y los tratamientos citotóxicos son más eficaces en células con una alta tasa de proliferación; la expresión de múltiples transportadores resistentes a fármacos; su localización en nichos hipóxicos, y una mayor capacidad de reparación del DNA (revisado en Diehn et al., 2009). Por tanto, es esencial la identificación de los mecanismos que confieren resistencia de forma específica a las LICs. Asimismo, la identificación de marcadores funcionales de las LICs que permitan su seguimiento en enfermedad mínima residual y la caracterización de dianas moleculares objeto de nuevas estrategias dirigidas a su eliminación son otros de los retos actuales en el tratamiento de la T-ALL. En ese contexto, nuestro trabajo sugiere que las LICs expresan IL-7R, y por tanto, una terapia dirigida frente al IL-7R sería eficaz

para su eliminación y, en último término, para la disminución de las recidivas. Asimismo, hemos sugerido la funcionalidad del pre-TCR en la función de las LICs. Nuestros experimentos futuros se centrarán, por tanto, en el análisis de la contribución de la señalización mediada por el IL-7R y el pre-TCR a la fisiopatología de las LICs y del valor del IL-7R y pre-TCR como marcadores de enfermedad mínima residual en la T-ALL y dianas moleculares de intervención terapéutica.

Conclusiones ■

1. El gen *Il7ra* es una diana transcripcional de Notch1 en los precursores intratímicos de los linfocitos T de ratón.
2. La activación de Notch1 regula la expresión temporal del IL-7R durante el desarrollo intratímico del ratón, controlando la supervivencia y proliferación de los precursores de los linfocitos T.
3. La sobreexpresión de una mutación activadora de Notch1 (ICN1) induce la expresión aberrante de receptores IL-7R funcionales durante el proceso de generación de la T-ALL, que son esenciales para la progresión leucémica *in vivo*.
4. El potencial leucemogénico de Notch1 es estrictamente dependiente de la expresión y función del IL-7R.
5. El IL-7R confiere una ventaja selectiva *in vivo* a las células T-ALL con actividad iniciadora de leucemia o LIC, por lo que se considera un marcador funcional de las LICs.
6. La señalización a través del pre-TCR es crucial en la patogénesis de la T-ALL dependiente de mutaciones activadoras de Notch1.
7. El residuo C80 del dominio extracelular de CD3 ϵ , necesario para el mantenimiento del estado conformacional activo del complejo pre-TCR, es determinante en la generación de la T-ALL inducida por ICN1.
8. La unión del adaptador Nck al complejo pre-TCR activo no es limitante en la patogénesis de la T-ALL inducida por ICN1, pero su inhibición reduce la progresión e incrementa el tiempo de latencia de la enfermedad.
9. IL-7R y pre-TCR, dos receptores implicados en la enorme expansión fisiológica de los precursores de los linfocitos T durante su diferenciación intratímica, desempeñan una función esencial en la patogénesis y progresión de la T-ALL inducida por ICN1; por lo que ambos receptores se vislumbran como prometedoras dianas de intervención terapéutica.

Bibliografía ■

- Adler, S. H., Chiffolleau, E., Xu, L., Dalton, N. M., Burg, J. M., Wells, A. D., Wolfe, M. S., Turka, L. A., Pear, W. S., 2003. Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol.* 171, 2896-903.
- Aifantis, I., Borowski, C., Gounari, F., Lacorazza, H. D., Nikolich-Zugich, J., von Boehmer, H., 2002. A critical role for the cytoplasmic tail of pTalpha in T lymphocyte development. *Nat Immunol.* 3, 483-8.
- Aifantis, I., Raetz, E., Buonamici, S., 2008. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol.* 8, 380-90.
- Allman, D., Karnell, F. G., Punt, J. A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G. A., Pui, J. C., Aster, J. C., Pear, W. S., 2001. Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med.* 194, 99-106.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J. P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., Bhandoola, A., 2003. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol.* 4, 168-74.
- Amsen, D., Kruisbeek, A. M., 1998. Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol Rev.* 165, 209-29.
- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F. W., Bateman, C. M., Guo, Y., Colman, S. M., Kempski, H., Moorman, A. V., Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T., Greaves, M., 2011. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature.* 469, 356-61.
- Anderson, M. K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R. A., Rothenberg, E. V., 1999. Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development.* 126, 3131-48.
- Anderson, M. K., Weiss, A. H., Hernandez-Hoyos, G., Dionne, C. J., Rothenberg, E. V., 2002. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity.* 16, 285-96.
- Ariel, A., HersHKoviz, R., Cahalon, L., Williams, D. E., Akiyama, S. K., Yamada, K. M., Chen, C., Alon, R., Lapidot, T., Lider, O., 1997. Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7. *Eur J Immunol.* 27, 2562-70.
- Armstrong, F., Brunet de la Grange, P., Gerby, B., Rouyez, M. C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Romeo, P. H., Ballerini, P., Pflumio, F., 2009. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood.* 113, 1730-40.

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 284, 770-6.
- Asnafi, V., Beldjord, K., Boulanger, E., Comba, B., Le Tutour, P., Estienne, M. H., Davi, F., Landman-Parker, J., Quartier, P., Buzyn, A., Delabesse, E., Valensi, F., Macintyre, E., 2003. Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. *Blood*. 101, 2693-703.
- Bains, T., Heinrich, M. C., Loriaux, M. M., Beadling, C., Nelson, D., Warrick, A., Neff, T. L., Tyner, J. W., Dunlap, J., Corless, C. L., Fan, G., 2012. Newly described activating JAK3 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 26, 2144-6.
- Balciunaite, G., Ceredig, R., Fehling, H. J., Zuñiga-Pflücker, J. C., Rolink, A. G., 2005a. The role of Notch and IL-7 signaling in early thymocyte proliferation and differentiation. *Eur J Immunol*. 35, 1292-300.
- Balciunaite, G., Ceredig, R., Rolink, A. G., 2005b. The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood*. 105, 1930-6.
- Barata, J. T., Cardoso, A. A., Nadler, L. M., Boussiotis, V. A., 2001. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood*. 98, 1524-31.
- Barata, J. T., Keenan, T. D., Silva, A., Nadler, L. M., Boussiotis, V. A., Cardoso, A. A., 2004a. Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 89, 1459-67.
- Barata, J. T., Silva, A., Brandao, J. G., Nadler, L. M., Cardoso, A. A., Boussiotis, V. A., 2004b. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 200, 659-69.
- Bell, J. J., Bhandoola, A., 2008. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*. 452, 764-7.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lendahl, U., Fehling, H. J., Hayday, A. C., Frati, L., von Boehmer, H., Gulino, A., Screpanti, I., 2002. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 3788-93.
- Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K. L., Parganas, E., Ihle, J., Singh, H., 2005. Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol*. 6, 836-43.

- Beverly, L. J., Felsher, D. W., Capobianco, A. J., 2005. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res.* 65, 7159-68.
- Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H. T., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2007. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity.* 26, 678-89.
- Blanco, R., Borroto, A., Schamel, W., Pereira, P., Alarcon, B., 2014. Conformational changes in the T cell receptor differentially determine T cell subset development in mice. *Sci Signal.* 7, ra115.
- Blom, B., Spits, H., 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.* 24, 287-320.
- Borroto, A., Arellano, I., Blanco, R., Fuentes, M., Orfao, A., Dopfer, E. P., Prouza, M., Suchanek, M., Schamel, W. W., Alarcon, B., 2014. Relevance of Nck-CD3 epsilon interaction for T cell activation in vivo. *J Immunol.* 192, 2042-53.
- Borroto, A., Arellano, I., Dopfer, E. P., Prouza, M., Suchanek, M., Fuentes, M., Orfao, A., Schamel, W. W., Alarcon, B., 2013. Nck recruitment to the TCR required for ZAP70 activation during thymic development. *J Immunol.* 190, 1103-12.
- Boudil, A., Matei, I. R., Shih, H. Y., Bogdanoski, G., Yuan, J. S., Chang, S. G., Montpellier, B., Kowalski, P. E., Voisin, V., Bashir, S., Bader, G. D., Krangel, M. S., Guidos, C. J., 2015. IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra recombination during thymocyte beta-selection. *Nat Immunol.* 16, 397-405.
- Bozkulak, E. C., Weinmaster, G., 2009. Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol.* 29, 5679-95.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., Israel, A., 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell.* 5, 207-16.
- Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M. G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B. G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J. C., Sen, F., Gehrie, E., Li, M., Newcomb, E., Zavadil, J., Meruelo, D., Lipp, M., Ibrahim, S., Efstratiadis, A., Zagzag, D., Bromberg, J. S., Dustin, M. L., Aifantis, I., 2009. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature.* 459, 1000-4.
- Burtrum, D. B., Kim, S., Dudley, E. C., Hayday, A. C., Petrie, H. T., 1996. TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development. *J Immunol.* 157, 4293-6.
- Campese, A. F., Garbe, A. I., Zhang, F., Grassi, F., Screpanti, I., von Boehmer, H., 2006. Notch1-dependent lymphomagenesis is assisted by but does not essentially require pre-TCR signaling. *Blood.* 108, 305-10.

- Carrasco, Y. R., Ramiro, A. R., Trigueros, C., de Yebenes, V. G., Garcia-Peydro, M., Toribio, M. L., 2001. An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels. *J Exp Med.* 193, 1045-58.
- Ciofani, M., Schmitt, T. M., Ciofani, A., Michie, A. M., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J. L., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2004. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol.* 172, 5230-9.
- Ciofani, M., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2005. Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol.* 6, 881-8.
- Ciofani, M., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2007. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23, 463-93.
- Clappier, E., Gerby, B., Sigaux, F., Delord, M., Touzri, F., Hernandez, L., Ballerini, P., Baruchel, A., Pflumio, F., Soulier, J., 2011. Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med.* 208, 653-61.
- Clements, J. L., Yang, B., Ross-Barta, S. E., Eliason, S. L., Hrstka, R. F., Williamson, R. A., Koretzky, G. A., 1998. Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science.* 281, 416-9.
- Costello, R., Brailly, H., Mallet, F., Mawas, C., Olive, D., 1993. Interleukin-7 is a potent co-stimulus of the adhesion pathway involving CD2 and CD28 molecules. *Immunology.* 80, 451-7.
- Cox, C. V., Martin, H. M., Kearns, P. R., Virgo, P., Evely, R. S., Blair, A., 2007. Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 109, 674-82.
- Crawley, J. B., Willcocks, J., Foxwell, B. M., 1996. Interleukin-7 induces T cell proliferation in the absence of Erk/MAP kinase activity. *Eur J Immunol.* 26, 2717-23.
- Cullion, K., Draheim, K. M., Hermance, N., Tammam, J., Sharma, V. M., Ware, C., Nikov, G., Krishnamoorthy, V., Majumder, P. K., Kelliher, M. A., 2009. Targeting the Notch1 and mTOR pathways in a mouse T-ALL model. *Blood.* 113, 6172-81.
- Chan, S. M., Weng, A. P., Tibshirani, R., Aster, J. C., Utz, P. J., 2007. Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 110, 278-86.
- Cheng, A. M., Negishi, I., Anderson, S. J., Chan, A. C., Bolen, J., Loh, D. Y., Pawson, T., 1997. The Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 9797-801.

- Chiang, M. Y., Xu, L., Shestova, O., Histen, G., L'Heureux, S., Romany, C., Childs, M. E., Gimotty, P. A., Aster, J. C., Pear, W. S., 2008. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest.* 118, 3181-94.
- Cho, S. K., Webber, T. D., Carlyle, J. R., Nakano, T., Lewis, S. M., Zuñiga-Pflücker, J. C., 1999. Functional characterization of B lymphocytes generated in vitro from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 9797-802.
- De Obaldia, M. E., Bell, J. J., Wang, X., Harly, C., Yashiro-Ohtani, Y., DeLong, J. H., Zlotoff, D. A., Sultana, D. A., Pear, W. S., Bhandoola, A., 2013. T cell development requires constraint of the myeloid regulator C/EBP- α by the Notch target and transcriptional repressor Hes1. *Nat Immunol.* 14, 1277-84.
- DeKoter, R. P., Lee, H. J., Singh, H., 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity.* 16, 297-309.
- DeKoter, R. P., Schweitzer, B. L., Kamath, M. B., Jones, D., Tagoh, H., Bonifer, C., Hildeman, D. A., Huang, K. J., 2007. Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells. *J Biol Chem.* 282, 14194-204.
- De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., Plum, J., 2002. Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J Immunol.* 169, 3021-9.
- Demarest, R. M., Dahmane, N., Capobianco, A. J., 2011. Notch is oncogenic dominant in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 117, 2901-9.
- Dick, J. E., 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 112, 4793-807.
- Diehn, M., Cho, R. W., Clarke, M. F., 2009. Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin Radiat Oncol.* 19, 78-86.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., Calos, M. P., 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* 7, 379-87.
- Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I., Littman, D. R., 2007. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med.* 204, 1945-57.
- Eguchi-Ishimae, M., Eguchi, M., Kempinski, H., Greaves, M., 2008. NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL. *Blood.* 111, 376-8.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D., Sklar, J., 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 66, 649-61.

- Espinosa, L., Cathelin, S., D'Altri, T., Trimarchi, T., Statnikov, A., Guiu, J., Rodilla, V., Ingles-Esteve, J., Nomdedeu, J., Bellosillo, B., Besses, C., Abdel-Wahab, O., Kucine, N., Sun, S. C., Song, G., Mullighan, C. C., Levine, R. L., Rajewsky, K., Aifantis, I., Bigas, A., 2010. The Notch/Hes1 pathway sustains NF-kappaB activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell*. 18, 268-81.
- Fehling, H. J., Iritani, B. M., Krotkova, A., Forbush, K. A., Laplace, C., Perlmutter, R. M., von Boehmer, H., 1997. Restoration of thymopoiesis in pT alpha-/- mice by anti-CD3epsilon antibody treatment or with transgenes encoding activated Lck or tailless pT alpha. *Immunity*. 6, 703-14.
- Flex, E., Petrangeli, V., Stella, L., Chiaretti, S., Hornakova, T., Knoops, L., Ariola, C., Fodale, V., Clappier, E., Paoloni, F., Martinelli, S., Fragale, A., Sanchez, M., Tavolaro, S., Messina, M., Cazzaniga, G., Camera, A., Pizzolo, G., Tornesello, A., Vignetti, M., Battistini, A., Cave, H., Gelb, B. D., Renauld, J. C., Biondi, A., Constantinescu, S. N., Foa, R., Tartaglia, M., 2008. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*. 205, 751-8.
- Foss, D. L., Donskoy, E., Goldschneider, I., 2001. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med*. 193, 365-74.
- Fowlkes, B. J., Edison, L., Mathieson, B. J., Chused, T. M., 1985. Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. *J Exp Med*. 162, 802-22.
- Fry, T. J., Mackall, C. L., 2002. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*. 99, 3892-904.
- Gachet, S., Genesca, E., Passaro, D., Irigoyen, M., Alcalde, H., Clemenson, C., Poglio, S., Pflumio, F., Janin, A., Lasgi, C., Dodier, S., Soyer, M., Dumenil, G., Ghysdael, J., 2013. Leukemia-initiating cell activity requires calcineurin in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 27, 2289-300.
- Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V. G., Toribio, M. L., 2006. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol*. 177, 3711-20.
- Geng, H., Hurtz, C., Lenz, K. B., Chen, Z., Baumjohann, D., Thompson, S., Goloviznina, N. A., Chen, W. Y., Huan, J., LaTocha, D., Ballabio, E., Xiao, G., Lee, J. W., Deucher, A., Qi, Z., Park, E., Huang, C., Nahar, R., Kweon, S. M., Shojaee, S., Chan, L. N., Yu, J., Kornblau, S. M., Bijl, J. J., Ye, B. H., Ansel, K. M., Paietta, E., Melnick, A., Hunger, S. P., Kurre, P., Tyner, J. W., Loh, M. L., Roeder, R. G., Druker, B. J., Burger, J. A., Milne, T. A., Chang, B. H., Muschen, M., 2015. Self-enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 27, 409-25.

- Giambra, V., Jenkins, C. R., Wang, H., Lam, S. H., Shevchuk, O. O., Nemirovsky, O., Wai, C., Gusscott, S., Chiang, M. Y., Aster, J. C., Humphries, R. K., Eaves, C., Weng, A. P., 2012. NOTCH1 promotes T cell leukemia-initiating activity by RUNX-mediated regulation of PKC-theta and reactive oxygen species. *Nat Med.* 18, 1693-8.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., Zlotnik, A., 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol.* 150, 4244-52.
- Gonzalez-Garcia, S., Garcia-Peydro, M., Martin-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., de la Pompa, J. L., Ferrando, A. A., Toribio, M. L., 2009. CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R{alpha} gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med.* 206, 779-91.
- Gonzalez-Garcia, S., Garcia-Peydro, M., Alcain, J., Toribio, M. L., 2012. Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 360, 47-73.
- Gorer, P. A., 1950. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br J Cancer.* 4, 372-9.
- Groettrup, M., Ungewiss, K., Azogui, O., Palacios, R., Owen, M. J., Hayday, A. C., von Boehmer, H., 1993. A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein. *Cell.* 75, 283-94.
- Gutierrez, A., Sanda, T., Grebliunaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y., Dahlberg, S., Neuberg, D., Moreau, L. A., Winter, S. S., Larson, R., Zhang, J., Protopopov, A., Chin, L., Pandolfi, P. P., Silverman, L. B., Hunger, S. P., Sallan, S. E., Look, A. T., 2009. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 114, 647-50.
- Haks, M. C., Oosterwegel, M. A., Blom, B., Spits, H. M., Kruisbeek, A. M., 1999. Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Semin Immunol.* 11, 23-37.
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., Honjo, T., 2002. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol.* 14, 637-45.
- Harman, B. C., Jenkinson, W. E., Parnell, S. M., Rossi, S. W., Jenkinson, E. J., Anderson, G., 2005. T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling. *Blood.* 106, 886-92.
- Hasserjian, R. P., Aster, J. C., Davi, F., Weinberg, D. S., Sklar, J., 1996. Modulated expression of notch1 during thymocyte development. *Blood.* 88, 970-6.

- Heinzel, K., Benz, C., Martins, V. C., Haidl, I. D., Bleul, C. C., 2007. Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *J Immunol.* 178, 858-68.
- Henriques, C. M., Rino, J., Nibbs, R. J., Graham, G. J., Barata, J. T., 2010. IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood.* 115, 3269-77.
- Hernandez Tejada, F. N., Galvez Silva, J. R., Zweidler-McKay, P. A., 2014. The challenge of targeting notch in hematologic malignancies. *Front Pediatr.* 2, 54.
- Hoffman, E. S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T. M., Schatz, D. G., Koff, A., Owen, M. J., Hayday, A. C., 1996. Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes Dev.* 10, 948-62.
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Hollander, G. A., Shima, D. T., Habu, S., 2008. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med.* 205, 2507-13.
- Huang, J., Durum, S. K., Muegge, K., 2001. Cutting edge: histone acetylation and recombination at the TCR gamma locus follows IL-7 induction. *J Immunol.* 167, 6073-7.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., Israel, A., 1995. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature.* 377, 355-8.
- Jiang, Q., Li, W. Q., Aiello, F. B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A. R., Durum, S. K., 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 513-33.
- Joshi, I., Minter, L. M., Telfer, J., Demarest, R. M., Capobianco, A. J., Aster, J. C., Sicinski, P., Fauq, A., Golde, T. E., Osborne, B. A., 2009. Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood.* 113, 1689-98.
- Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., Hedrick, S. M., 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat Immunol.* 10, 176-84.
- Knoechel, B., Roderick, J. E., Williamson, K. E., Zhu, J., Lohr, J. G., Cotton, M. J., Gillespie, S. M., Fernandez, D., Ku, M., Wang, H., Piccioni, F., Silver, S. J., Jain, M., Pearson, D., Kluk, M. J., Ott, C. J., Shultz, L. D., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Gutierrez, A., Stegmaier, K., Kung, A. L., Root, D. E., Bradner, J. E., Aster, J. C., Kelliher, M. A., Bernstein, B. E., 2014. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 46, 364-70.

- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N. R., Duarte, A., Macdonald, H. R., Radtke, F., 2008. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med.* 205, 2515-23.
- Kopan, R., Ilagan, M. X., 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137, 216-33.
- Kreso, A., Dick, J. E., 2014. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 14, 275-91.
- Kruisbeek, A. M., Haks, M. C., Carleton, M., Michie, A. M., Zuñiga-Pflücker, J. C., Wiest, D. L., 2000. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol Today.* 21, 637-44.
- Lahortiga, I., De Keersmaecker, K., Van Vlierberghe, P., Graux, C., Cauwelier, B., Lambert, F., Mentens, N., Beverloo, H. B., Pieters, R., Speleman, F., Odero, M. D., Bauters, M., Froyen, G., Marynen, P., Vandenberghe, P., Wlodarska, I., Meijerink, J. P., Cools, J., 2007. Duplication of the MYB oncogene in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 39, 593-5.
- Laouar, Y., Crispe, I. N., Flavell, R. A., 2004. Overexpression of IL-7R alpha provides a competitive advantage during early T-cell development. *Blood.* 103, 1985-94.
- Lee, K., Nam, K. T., Cho, S. H., Gudapati, P., Hwang, Y., Park, D. S., Potter, R., Chen, J., Volanakis, E., Boothby, M., 2012. Vital roles of mTOR complex 2 in Notch-driven thymocyte differentiation and leukemia. *J Exp Med.* 209, 713-28.
- Leonard, W. J., 2001. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol.* 1, 200-8.
- Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K., von Boehmer, H., 2008. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med.* 205, 2851-61.
- Li, X., von Boehmer, H., 2011. Notch Signaling in T-Cell Development and T-ALL. *ISRN Hematol.* 2011, 921706.
- Lin, Y. W., Nichols, R. A., Letterio, J. J., Aplan, P. D., 2006. Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia/lymphoma. *Blood.* 107, 2540-3.
- Liu, H., Chiang, M. Y., Pear, W. S., 2011. Critical roles of NOTCH1 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 94, 118-25.

- Ma, W., Gutierrez, A., Goff, D. J., Geron, I., Sadarangani, A., Jamieson, C. A., Court, A. C., Shih, A. Y., Jiang, Q., Wu, C. C., Li, K., Smith, K. M., Crews, L. A., Gibson, N. W., Deichaite, I., Morris, S. R., Wei, P., Carson, D. A., Look, A. T., Jamieson, C. H., 2012. NOTCH1 signaling promotes human T-cell acute lymphoblastic leukemia initiating cell regeneration in supportive niches. *PLoS One*. 7, e39725.
- Maillard, I., Fang, T., Pear, W. S., 2005. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol*. 23, 945-74.
- Maillard, I., Tu, L., Sambandam, A., Yashiro-Ohtani, Y., Millholland, J., Keeshan, K., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A., Pear, W. S., 2006. The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J Exp Med*. 203, 2239-45.
- Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J. I., Ikuta, K., 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 7172-7.
- Maraskovsky, E., O'Reilly, L. A., Teepe, M., Corcoran, L. M., Peschon, J. J., Strasser, A., 1997. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1/- mice. *Cell*. 89, 1011-9.
- Maraskovsky, E., Peschon, J. J., McKenna, H., Teepe, M., Strasser, A., 1998. Overexpression of Bcl-2 does not rescue impaired B lymphopoiesis in IL-7 receptor-deficient mice but can enhance survival of mature B cells. *Int Immunol*. 10, 1367-75.
- Maraskovsky, E., Teepe, M., Morrissey, P. J., Braddy, S., Miller, R. E., Lynch, D. H., Peschon, J. J., 1996. Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J Immunol*. 157, 5315-23.
- Martinez-Martin, N., Risueno, R. M., Morreale, A., Zaldivar, I., Fernandez-Arenas, E., Herranz, F., Ortiz, A. R., Alarcon, B., 2009. Cooperativity between T cell receptor complexes revealed by conformational mutants of CD3epsilon. *Sci Signal*. 2, ra43.
- Mazzucchelli, R., Durum, S. K., 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 7, 144-54.
- Mazzucchelli, R. I., Riva, A., Durum, S. K., 2012. The human IL-7 receptor gene: deletions, polymorphisms and mutations. *Semin Immunol*. 24, 225-30.
- Meacham, C. E., Morrison, S. J., 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 501, 328-37.
- Medyouf, H., Alcalde, H., Berthier, C., Guillemin, M. C., dos Santos, N. R., Janin, A., Decaudin, D., de The, H., Ghysdael, J., 2007. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 13, 736-41.

- Medyouf, H., Gusscott, S., Wang, H., Tseng, J. C., Wai, C., Nemirovsky, O., Trumpp, A., Pflumio, F., Carboni, J., Gottardis, M., Pollak, M., Kung, A. L., Aster, J. C., Holzenberger, M., Weng, A. P., 2011. High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. *J Exp Med.* 208, 1809-22.
- Michie, A. M., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2002. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol.* 14, 311-23.
- Miller, J. F., Osoba, D., 1967. Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol Rev.* 47, 437-520.
- Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N., Del Bianco, C., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Kung, A. L., Gilliland, D. G., Verdine, G. L., Bradner, J. E., 2009. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature.* 462, 182-8.
- Mohtashami, M., Shah, D. K., Nakase, H., Kianizad, K., Petrie, H. T., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2010. Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *J Immunol.* 185, 867-76.
- Molina, T. J., Kishihara, K., Siderovski, D. P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C. J., Hartmann, K. U., Veillette, A., et al., 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature.* 357, 161-4.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S., Vogt, T. F., 2000. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature.* 406, 369-75.
- Mungamuri, S. K., Yang, X., Thor, A. D., Somasundaram, K., 2006. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53. *Cancer Res.* 66, 4715-24.
- Munitic, I., Williams, J. A., Yang, Y., Dong, B., Lucas, P. J., El Kassar, N., Gress, R. E., Ashwell, J. D., 2004. Dynamic regulation of IL-7 receptor expression is required for normal thymopoiesis. *Blood.* 104, 4165-72.
- Navarro, M. N., Nusspaumer, G., Fuentes, P., Gonzalez-Garcia, S., Alcain, J., Toribio, M. L., 2007. Identification of CMS as a cytosolic adaptor of the human pTalpha chain involved in pre-TCR function. *Blood.* 110, 4331-40.
- Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A., Sun, X. H., 2003. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *EMBO J.* 22, 5780-92.
- Niemann, C. U., Wiestner, A., 2013. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol.* 23, 410-21.

- Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W., Leonard, W. J., 1993. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*. 73, 147-57.
- Nolta, J. A., Dao, M. A., Wells, S., Smogorzewska, E. M., Kohn, D. B., 1996. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 2414-9.
- O'Shea, C. C., Thornell, A. P., Rosewell, I. R., Hayes, B., Owen, M. J., 1997. Exit of the pre-TCR from the ER/cis-Golgi is necessary for signaling differentiation, proliferation, and allelic exclusion in immature thymocytes. *Immunity*. 7, 591-9.
- Oosterwegel, M. A., Haks, M. C., Jeffry, U., Murray, R., Kruisbeek, A. M., 1997. Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. *Immunity*. 6, 351-60.
- Ott, C. J., Kopp, N., Bird, L., Paranal, R. M., Qi, J., Bowman, T., Rodig, S. J., Kung, A. L., Bradner, J. E., Weinstock, D. M., 2012. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 120, 2843-52.
- Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A., Li, M. O., 2009. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity*. 30, 358-71.
- Palomero, T., Barnes, K. C., Real, P. J., Glade Bender, J. L., Sulis, M. L., Murty, V. V., Colovai, A. I., Balbin, M., Ferrando, A. A., 2006a. CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. *Leukemia*. 20, 1279-87.
- Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., Barnes, K. C., O'Neil, J., Neuberg, D., Weng, A. P., Aster, J. C., Sigaux, F., Soulier, J., Look, A. T., Young, R. A., Califano, A., Ferrando, A. A., 2006b. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 18261-6.
- Palomero, T., Sulis, M. L., Cortina, M., Real, P. J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S. L., Bhagat, G., Agarwal, A. M., Basso, G., Castillo, M., Nagase, S., Cordon-Cardo, C., Parsons, R., Zuñiga-Pflücker, J. C., Dominguez, M., Ferrando, A. A., 2007. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*. 13, 1203-10.
- Pallard, C., Stegmann, A. P., van Kleffens, T., Smart, F., Venkitaraman, A., Spits, H., 1999. Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity*. 10, 525-35.

- Park, J. H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J. S., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., Singer, A., 2004. Suppression of IL7R α transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity*. 21, 289-302.
- Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Morrissey, P. J., Paxton, R., Sims, J. E., 2000. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med*. 192, 659-70.
- Passoni, L., Hoffman, E. S., Kim, S., Crompton, T., Pao, W., Dong, M. Q., Owen, M. J., Hayday, A. C., 1997. Intrathymic delta selection events in gammadelta cell development. *Immunity*. 7, 83-95.
- Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J., Baltimore, D., 1996. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med*. 183, 2283-91.
- Pear, W. S., Radtke, F., 2003. Notch signaling in lymphopoiesis. *Semin Immunol*. 15, 69-79.
- Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D., Davison, B. L., 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 180, 1955-60.
- Petrie, H. T., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2007. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*. 25, 649-79.
- Pivniouk, V., Tsitsikov, E., Swinton, P., Rathbun, G., Alt, F. W., Geha, R. S., 1998. Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell*. 94, 229-38.
- Porritt, H. E., Rumfelt, L. L., Tabrizifard, S., Schmitt, T. M., Zuñiga-Pflücker, J. C., Petrie, H. T., 2004. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*. 20, 735-45.
- Puel, A., Ziegler, S. F., Buckley, R. H., Leonard, W. J., 1998. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*. 20, 394-7.
- Pui, C. H., Relling, M. V., Downing, J. R., 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 350, 1535-48.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., Pear, W. S., 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 11, 299-308.

- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., Morrison, S. J., 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 456, 593-8.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., Aguet, M., 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 10, 547-58.
- Ramiro, A. R., Navarro, M. N., Carreira, A., Carrasco, Y. R., de Yébenes, V. G., Carrillo, G., San Millán, J. L., Rubin, B., Toribio, M. L., 2001. Differential developmental regulation and functional effects on pre-TCR surface expression of human pTalpha(a) and pTalpha(b) spliced isoforms. *J Immunol*. 167, 5106-14.
- Real, P. J., Tosello, V., Palomero, T., Castillo, M., Hernando, E., de Stanchina, E., Sulis, M. L., Barnes, K., Sawai, C., Homminga, I., Meijerink, J., Aifantis, I., Basso, G., Cordon-Cardo, C., Ai, W., Ferrando, A., 2009. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 15, 50-8.
- Reizis, B., Leder, P., 2002. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev*. 16, 295-300.
- Reschly, E. J., Spaulding, C., Vilimas, T., Graham, W. V., Brumbaugh, R. L., Aifantis, I., Pear, W. S., Kee, B. L., 2006. Notch1 promotes survival of E2A-deficient T cell lymphomas through pre-T cell receptor-dependent and -independent mechanisms. *Blood*. 107, 4115-21.
- Ribeiro, D., Melao, A., Barata, J. T., 2013. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Adv Biol Regul*. 53, 211-22.
- Rich, B. E., Campos-Torres, J., Tepper, R. I., Moreadith, R. W., Leder, P., 1993. Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. *J Exp Med*. 177, 305-16.
- Roderick, J. E., Tesell, J., Shultz, L. D., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Harris, M. H., Silverman, L. B., Sallan, S. E., Gutierrez, A., Look, A. T., Qi, J., Bradner, J. E., Kelliher, M. A., 2014. c-Myc inhibition prevents leukemia initiation in mice and impairs the growth of relapsed and induction failure pediatric T-ALL cells. *Blood*. 123, 1040-50.
- Ronchini, C., Capobianco, A. J., 2001. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Mol Cell Biol*. 21, 5925-34.
- Rothenberg, E. V., 2007. Negotiation of the T lineage fate decision by transcription-factor interplay and microenvironmental signals. *Immunity*. 26, 690-702.
- Rothenberg, E. V., 2012. Transcriptional drivers of the T-cell lineage program. *Curr Opin Immunol*. 24, 132-8.

- Rothenberg, E. V., Moore, J. E., Yui, M. A., 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol.* 8, 9-21.
- Roti, G., Stegmaier, K., 2014. New Approaches to Target T-ALL. *Front Oncol.* 4, 170.
- Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V. P., Xu, L., Gerstein, R. M., Aster, J. C., Pear, W. S., Bhandoola, A., 2005. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol.* 6, 663-70.
- Saint-Ruf, C., Panigada, M., Azogui, O., Debey, P., von Boehmer, H., Grassi, F., 2000. Different initiation of pre-TCR and gammadeltaTCR signalling. *Nature.* 406, 524-7.
- Sambandam, A., Maillard, I., Zediak, V. P., Xu, L., Gerstein, R. M., Aster, J. C., Pear, W. S., Bhandoola, A., 2005. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol.* 6, 663-70.
- Scupoli, M. T., Perbellini, O., Krampera, M., Vinante, F., Cioffi, F., Pizzolo, G., 2007. Interleukin 7 requirement for survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia and human thymocytes on bone marrow stroma. *Haematologica.* 92, 264-6.
- Scupoli, M. T., Vinante, F., Krampera, M., Vincenzi, C., Nadali, G., Zampieri, F., Ritter, M. A., Eren, E., Santini, F., Pizzolo, G., 2003. Thymic epithelial cells promote survival of human T-cell acute lymphoblastic leukemia blasts: the role of interleukin-7. *Haematologica.* 88, 1229-37.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., Lefrancois, L., 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol.* 1, 426-32.
- Schmitt, T. M., Ciofani, M., Petrie, H. T., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2004. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med.* 200, 469-79.
- Schmitt, T. M., Zuñiga-Pflücker, J. C., 2002. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity.* 17, 749-56.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G., 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 19, 621-6.
- Schubbert, S., Cardenas, A., Chen, H., Garcia, C., Guo, W., Bradner, J. E., Wu, H., 2014. Targeting the MYC and PI3K pathways eliminates leukemia-initiating cells in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.*
- Serwold, T., Hochedlinger, K., Swindle, J., Hedgpeth, J., Jaenisch, R., Weissman, I. L., 2010. T-cell receptor-driven lymphomagenesis in mice derived from a reprogrammed T cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 18939-43.

- Sharma, V. M., Calvo, J. A., Draheim, K. M., Cunningham, L. A., Hermance, N., Beverly, L., Krishnamoorthy, V., Bhasin, M., Capobianco, A. J., Kelliher, M. A., 2006. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol.* 26, 8022-31.
- Shen, H. Q., Lu, M., Ikawa, T., Masuda, K., Ohmura, K., Minato, N., Katsura, Y., Kawamoto, H., 2003. T/NK bipotent progenitors in the thymus retain the potential to generate dendritic cells. *J Immunol.* 171, 3401-6.
- Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O. R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A. E., Stanulla, M., Schrappe, M., Biondi, A., Basso, G., Bercovich, D., Muckenthaler, M. U., Izraeli, S., 2011. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor-alpha (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med.* 208, 901-8.
- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J., Scollay, R., 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol.* 2, 3-12.
- Shortman, K., Wu, L., 1996. Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol.* 14, 29-47.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A. A., Levin, S. D., Geng, Y., von Boehmer, H., Sicinski, P., 2003. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell.* 4, 451-61.
- Silva, A., Girio, A., Cebola, I., Santos, C. I., Antunes, F., Barata, J. T., 2011a. Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia.* 25, 960-7.
- Silva, A., Laranjeira, A. B., Martins, L. R., Cardoso, B. A., Demengeot, J., Yunes, J. A., Seddon, B., Barata, J. T., 2011b. IL-7 contributes to the progression of human T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Res.* 71, 4780-9.
- Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., Yoshida, H., 1993. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 9125-9.
- Sulis, M. L., Saftig, P., Ferrando, A. A., 2011. Redundancy and specificity of the metalloprotease system mediating oncogenic NOTCH1 activation in T-ALL. *Leukemia.* 25, 1564-9.
- Swainson, L., Kinet, S., Mongellaz, C., Sourisseau, M., Henriques, T., Taylor, N., 2007. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood.* 109, 1034-42.
- Taghon, T., Yui, M. A., Pant, R., Diamond, R. A., Rothenberg, E. V., 2006. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity.* 24, 53-64.

- Taghon, T. N., David, E. S., Zuñiga-Pflücker, J. C., Rothenberg, E. V., 2005. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev.* 19, 965-78.
- Takahama, Y., 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 6, 127-35.
- Tan, J. B., Visan, I., Yuan, J. S., Guidos, C. J., 2005. Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. *Nat Immunol.* 6, 671-9.
- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., Honjo, T., 2004. Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity.* 20, 611-22.
- Tatarek, J., Cullion, K., Ashworth, T., Gerstein, R., Aster, J. C., Kelliher, M. A., 2011. Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL. *Blood.* 118, 1579-90.
- Thompson, B. J., Buonamici, S., Sulis, M. L., Palomero, T., Vilimas, T., Basso, G., Ferrando, A., Aifantis, I., 2007. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med.* 204, 1825-35.
- Tremblay, M., Tremblay, C. S., Herblot, S., Aplan, P. D., Hebert, J., Perreault, C., Hoang, T., 2010. Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev.* 24, 1093-105.
- Trigueros, C., Hozumi, K., Silva-Santos, B., Bruno, L., Hayday, A. C., Owen, M. J., Pennington, D. J., 2003. Pre-TCR signaling regulates IL-7 receptor alpha expression promoting thymocyte survival at the transition from the double-negative to double-positive stage. *Eur J Immunol.* 33, 1968-77.
- Uckun, F. M., Gaynon, P. S., Sensel, M. G., Nachman, J., Trigg, M. E., Steinherz, P. G., Hutchinson, R., Bostrom, B. C., Sather, H. N., Reaman, G. H., 1997. Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 15, 2214-21.
- van Tetering, G., van Diest, P., Verlaan, I., van der Wall, E., Kopan, R., Vooijs, M., 2009. Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem.* 284, 31018-27.

- Van Vlierberghe, P., Palomero, T., Khiabani, H., Van der Meulen, J., Castillo, M., Van Roy, N., De Moerloose, B., Philippe, J., Gonzalez-Garcia, S., Toribio, M. L., Taghon, T., Zurbier, L., Cauwelier, B., Harrison, C. J., Schwab, C., Pisecker, M., Strehl, S., Langerak, A. W., Gecz, J., Sonneveld, E., Pieters, R., Paietta, E., Rowe, J. M., Wiernik, P. H., Benoit, Y., Soulier, J., Poppe, B., Yao, X., Cordon-Cardo, C., Meijerink, J., Rabadan, R., Speleman, F., Ferrando, A., 2010. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 42, 338-42.
- Vilimas, T., Mascarenhas, J., Palomero, T., Mandal, M., Buonamici, S., Meng, F., Thompson, B., Spaulding, C., Macaroun, S., Alegre, M. L., Kee, B. L., Ferrando, A., Miele, L., Aifantis, I., 2007. Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med.* 13, 70-7.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Zober, C., Garcia, C., Buer, J., 1998. Crucial function of the pre-T-cell receptor (TCR) in TCR beta selection, TCR beta allelic exclusion and alpha beta versus gamma delta lineage commitment. *Immunol Rev.* 165, 111-9.
- von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., Murray, R., 1997. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity.* 7, 147-54.
- von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E., Murray, R., 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med.* 181, 1519-26.
- Wang, H., Pierce, L. J., Spangrude, G. J., 2006. Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T-cell differentiation culture system. *Exp Hematol.* 34, 1730-40.
- Wang, H., Zou, J., Zhao, B., Johannsen, E., Ashworth, T., Wong, H., Pear, W. S., Schug, J., Blacklow, S. C., Arnett, K. L., Bernstein, B. E., Kieff, E., Aster, J. C., 2011. Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 14908-13.
- Wang, J. C., Dick, J. E., 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 15, 494-501.
- Weber, B. N., Chi, A. W., Chavez, A., Yashiro-Ohtani, Y., Yang, Q., Shestova, O., Bhandoola, A., 2011. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature.* 476, 63-8.
- Weerkamp, F., Baert, M. R., Brugman, M. H., Dik, W. A., de Haas, E. F., Visser, T. P., de Groot, C. J., Wagemaker, G., van Dongen, J. J., Staal, F. J., 2006. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood.* 107, 3131-7.

- Wendorff, A. A., Koch, U., Wunderlich, F. T., Wirth, S., Dubey, C., Bruning, J. C., MacDonald, H. R., Radtke, F., 2010. Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical Notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity*. 33, 671-84.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., Aster, J. C., 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 306, 269-71.
- Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M. S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S. C., Pear, W. S., Aster, J. C., 2006. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*. 20, 1096-109.
- Weng, A. P., Nam, Y., Wolfe, M. S., Pear, W. S., Griffin, J. D., Blacklow, S. C., Aster, J. C., 2003. Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol*. 23, 655-64.
- Winter, S. S., Sweatman, J. J., Lawrence, M. B., Rhoades, T. H., Hart, A. L., Larson, R. S., 2001. Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br J Haematol*. 115, 862-71.
- Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D. R., Lee, P. P., Wilson, C. B., Held, W., MacDonald, H. R., Radtke, F., 2001. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol*. 2, 235-41.
- Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H. R., Radtke, F., 2002. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity*. 16, 869-79.
- Wright, D. E., Wagers, A. J., Gulati, A. P., Johnson, F. L., Weissman, I. L., 2001. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 294, 1933-6.
- Xue, H. H., Bollenbacher, J., Rovella, V., Tripuraneni, R., Du, Y. B., Liu, C. Y., Williams, A., McCoy, J. P., Leonard, W. J., 2004. GA binding protein regulates interleukin 7 receptor alpha-chain gene expression in T cells. *Nat Immunol*. 5, 1036-44.
- Ye, S. K., Agata, Y., Lee, H. C., Kurooka, H., Kitamura, T., Shimizu, A., Honjo, T., Ikuta, K., 2001. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRgamma locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity*. 15, 813-23.
- Ye, S. K., Maki, K., Kitamura, T., Sunaga, S., Akashi, K., Domen, J., Weissman, I. L., Honjo, T., Ikuta, K., 1999. Induction of germline transcription in the TCRgamma locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity*. 11, 213-23.

- Yokoyama, K., Yokoyama, N., Izawa, K., Kotani, A., Harashima, A., Hozumi, K., Tojo, A., 2013. In vivo leukemogenic potential of an interleukin 7 receptor alpha chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 122, 4259-63.
- Yu, Q., Erman, B., Park, J. H., Feigenbaum, L., Singer, A., 2004. IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and RORgammat: impact on thymocyte development. *J Exp Med*. 200, 797-803.
- Yu, Q., Park, J. H., Doan, L. L., Erman, B., Feigenbaum, L., Singer, A., 2006. Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J Exp Med*. 203, 165-75.
- Yui, M. A., Feng, N., Rothenberg, E. V., 2010. Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *J Immunol*. 185, 284-93.
- Zenatti, P. P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M. C., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J. A., Silveira, A. B., Cardoso, B. A., Sarmento, L. M., Correia, N., Toribio, M. L., Kobarg, J., Horstmann, M., Pieters, R., Brandalise, S. R., Ferrando, A. A., Meijerink, J. P., Durum, S. K., Yunes, J. A., Barata, J. T., 2011. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 43, 932-9.
- Zhang, W., Sommers, C. L., Burshtyn, D. N., Stebbins, C. C., DeJarnette, J. B., Tribble, R. P., Grinberg, A., Tsay, H. C., Jacobs, H. M., Kessler, C. M., Long, E. O., Love, P. E., Samelson, L. E., 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity*. 10, 323-32.
- Zuñiga-Pflücker, J. C., 2004. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol*. 4, 67-72.